

SARA RAQUEL DA SILVA NOBRE

**PROTOCOLO REPRODUTIVO EM BOVINOS –
AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE $\text{PGF}_{2\alpha}$ NO MOMENTO
DE REMOÇÃO DE CIDR**

Orientador: Doutor Carlos Bettencourt

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

LISBOA

2017

SARA RAQUEL DA SILVA NOBRE

**PROTOCOLO REPRODUTIVO EM BOVINOS –
AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE PGF_{2α} NO MOMENTO
DE REMOÇÃO DE CIDR**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 30 de Novembro de 2017 com o despacho de Júri nº 414/2017 com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Margarida Alves

Arguente: Professora Doutora Ana Sousa Lopes

Orientador: Professor Doutor Carlos Bettencourt

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

LISBOA

2017

*“Mas é preciso andar. De nada serve estar parado.
Não há alternativa: é o progresso ou a inércia.
Avancemos e... com um sorriso nos lábios!...”*

Robert Baden-Powell

Para a minha querida avó, que tanto esperou e que ao longo de todo o curso me apoiou de inúmeras maneiras.

Aos meus pais, que sempre estiveram lá para mim e que nunca me deixaram desistir deste sonho.

Resumo

A reprodução de ruminantes nos dias atuais tornou-se muito diferente do que era realizado há um século atrás, devido quer ao aparecimento da Inseminação Artificial (IA) quer ao desenvolvimento dos protocolos de controlo hormonal.

Com este trabalho, pretendeu-se introduzir uma alteração num protocolo reprodutivo com o objetivo de diminuir uma manipulação dos animais e consequentemente os custos e o stress que essa manipulação implica.

Numa amostra de 20 vacas leiteiras ($n=20$), administrou-se GnRH e colocou-se um CIDR no dia 0. No dia 6 dividiu-se a amostra em dois grupos e administrou-se a um grupo (controlo) 5 ml do análogo da $\text{PGF}_{2\alpha}$ enquanto que no outro grupo (tratamento), esta administração ocorreu no dia 7, coincidindo com a retirada do CIDR feita em todas as vacas. Realizou-se IA a tempo fixo (IATF) 72 horas após a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$, complementando-se com a realização de deteção de cios. Realizaram-se ainda ultrassonografias retais a todos os animais nos dias 0, 7 e dia da IA a fim de registar todas as alterações sofridas nas gónadas e trato reprodutivo. Os dados recolhidos incluem a presença, número e tamanho de folículos e corpos de lúteo e a tonicidade e presença de muco do útero.

Os resultados obtidos foram inferiores ao que era esperado, uma vez que a taxa de conceção obtida foi de apenas 20% para o Grupo Controlo e 30% para o Grupo Tratamento, muito inferior quando comparado com a literatura disponível. Apesar disso, pôde-se verificar que o uso da $\text{PGF}_{2\alpha}$ no momento da retirada do CIDR pode ser uma boa aposta principalmente em animais de mais difícil maneio e que sofram facilmente de stress uma vez que se reduz uma manipulação, ou até mesmo para economizar nos custos de logística.

Palavras-chave: “Inseminação Artificial”; “ $\text{PGF}_{2\alpha}$ ”; “CIDR”; “Taxa de Conceção”.

Abstract

Nowadays a great improvement has been obtained in reproductive management in ruminants namely by the emergence of Artificial Insemination (AI) and the development of hormonal protocols.

In this work we intended to introduce an alteration in a reproductive protocol with the aim of lowering animal manipulation and consequently, the costs and stress that this implies in labor and animal welfare.

GnRH was administered in day 0 to a sample of 20 dairy cows ($n = 20$) which also received a CIDR . In day 6 the sample was divided in two as a control group ($n=10$) that received 5 ml of an analogue of $\text{PGF}_{2\alpha}$ and the treatment group ($n=10$) received the same dosis in D7. At this time, CIDR was withdrawal from all cows. IATF took place 72 hours after the administration of $\text{PGF}_{2\alpha}$, and estrous occurrence recorded. Retal ultrasound examination was performed to all cows on days 0, 7 and at the day of AI. Data recorded included presence and size of follicles and corpus luteum and the tonicity and presence of mucous in the reproductive tract.

The results obtained in this study were in terms of conception rate lower than those described in the literature (20% vs 30% in control and treatment group, respectively). Despite this, it seems that the use of $\text{PGF}_{2\alpha}$ at the moment of CIDR's removal, could be a good option, especially in hard-handling animals, which easily suffer stress from handling or even to reduce the logistic costs.

Keywords: "Artificial Insemination"; " $\text{PGF}_{2\alpha}$ "; "CIDR"; "Conception Rate".

Abreviaturas

AI	Artificial Insemination
BEN	Balanço Energético Negativo
CIDR	Controlled internal drug releaser
CL	Corpo de Lúteo
DG	Diagnóstico de Gestação
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
FSH	Hormona Folículo-estimulante
G	Gaus
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormone
h	Horas
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial a Tempo Fixo
ICC	Índice de Condição Corporal
kg	Quilograma
LH	Hormona Luteinizante
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
ml	Mililitro
mm	Milímetro
nº	Número
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotrophin
PRID	Progesterone-releasing intravaginal device
PVE	Período Voluntário de Espera
TAI	Timed Artificial Insemination
TC	Taxa de Conceção
UI	Unidade Internacional
vs.	versus
µg	microgramas

Índice Geral

Epigrafe	2
Dedicatória	3
Resumo	4
Abstract	5
Abreviaturas, siglas e símbolos	6
Índice geral	7
Índice de tabelas	9
Índice de gráficos	9
Índice de figuras	10
PARTE I - Fundamentação Teórica	12
1. Introdução	13
1.1. Casuística do estágio	13
2. Fisiologia	15
3. Endocrinologia	16
4. Fatores externos que influenciam os ciclos reprodutivos	17
5. Detecção de cio	19
6. Ecografia	23
7. Protocolos de sincronização	24
7.1. Prostaglandina	24
7.2. Ovsynch	27
7.3. Cosynch	28
7.4. Heatsynch	28
7.5. Progesterona	29
7.6. Gonadotrofina Coriônica Humana	31
7.7. Gonadotrofina Coriônica equina	31
8. Inseminação Artificial	33
PARTE II – Parte Experimental	36
1. Introdução ao estudo	37
1.1. Objetivos	37
2. Material e Métodos	38

2.1. Seleção da amostra	38
2.1.1. A Exploração	38
2.1.2. Escolha da amostra	38
2.1.3. Escolha dos grupos em estudo	39
2.2. Protocolo reprodutivo	40
2.2.1. Fármacos	41
2.3. Procedimentos	42
2.3.1. Método de IA	44
2.4. Recolha e Análise de dados	46
3. Resultados	48
3.1. Análise Retrospectiva da Exploração	48
3.2. Protocolo Reprodutivo	49
3.3. Resultados Ecográficos das Gónadas ao longo do estudo	55
4. Discussão	59
4.1. Seleção da amostra	59
4.1.1. A exploração	60
4.2. Análise da seleção do Protocolo Reprodutivo	62
4.3. Análise de dados / Análise dos resultados obtidos	63
4.3.1. Resultados obtidos vs. Morte Embrionária	64
4.3.2. Resultados obtidos vs. Lactação	65
4.3.3. Resultados obtidos vs. Intervalo Parto-Protocolo	66
4.3.4. Resultados obtidos vs. Manifestação de cio	66
4.3.5. Resultados obtidos vs. Sinais de cio	68
4.3.6. Resultados obtidos vs. Resultados Ecográficos	69
4.4. Aspectos positivos e negativos do estudo	75
5. Conclusão	77
Bibliografia	78
Apêndice I	I

Índice de Tabelas

Tabela 1: Características gerais (idade, nº de lactações, intervalo parto-protocolo, nº de inseminações) dos animais nos dois grupos da amostra seleccionada para o estudo. Usou-se para selecção a data de nascimento, o número de lactações, a data do último parto e o número de IAs realizadas desde o último parto	40
Tabela 2: Análise dos parâmetros reprodutivos da exploração em estudo no ano de 2012 e comparação com os valores referência de Boersema et al. (2010)	48
Tabela 3: Caracterização dos animais segundo o Grupo, número de lactações, paridade, número de IA já realizadas desde o último parto, intervalo parto-protocolo e por fim, o resultado geral do diagnóstico de gestação final (os valores apresentados são os recolhidos no início do protocolo, mais precisamente no D0, à excepção do diagnóstico de gestação que se encontra nesta tabela para uma mais fácil leitura).	52
Tabela 4: Resultados obtidos na observação de cio e ao exame físico dos animais no dia da IA (D9 e D10 para as vacas do grupo controlo e do grupo tratamento, respetivamente)	54
Tabela 5: Descrição morfológica das gónadas dos animais em estudo, realizadas por ecografia transretal aos dias 0, 7 e 9 de protocolo para o grupo controlo, para comparação com os resultados obtidos (DGf).	55
Tabela 6: Descrição morfológica das gónadas dos animais em estudo, realizadas por ecografia transretal aos dias 0, 7 e 10 de protocolo para o grupo tratamento.	56

Índice de Gráficos

Gráfico 1: nº (número) de consultas realizadas durante o Estágio Curricular, entre Setembro e Dezembro de 2012	14
Gráfico 2: Especificação do nº e tipo de consulta realizadas em bovinos de carne e leite.	14
Gráfico 3: Resultados do diagnóstico de gestação precoce por ecografia nos grupos do estudo realizado ao Dia 39 do início do protocolo.	49
Gráfico 4: Resultados do diagnóstico de gestação final por ecografia nos grupos do estudo realizado aos 90 dias pós-inseminação (C = Grupo Controlo; T = Grupo Tratamento).	49
Gráfico 5: Presença de estruturas significativas em cada animal no momento de início do protocolo (a), ao dia 7 (b) e ao dia 9 para vacas do grupo controlo e dia 10 para as vacas do grupo tratamento (c).	58

Índice de Figuras

Figura 1: Ausência de pelo na base da cauda de vaca que indica que esta esteve em cio e foi montada por outra ou por um macho (fotografia original)	19
Figura 2: Vulva de vaca edemaciada e avermelhada devido à manifestação de cio (fotografia original)	20
Figura 3: Tipos de protocolos de sincronização de cio que utilizam a prostaglandina (adaptado de Cavalieri <i>et al.</i> , 2006)	26
Figura 4: Esquema de protocolo <i>Ovsynch</i> (adaptado de Cavalieri <i>et al.</i> , 2006)	27
Figura 5: Esquema de protocolo <i>Cosynch</i> (adaptado de Cavalieri <i>et al.</i> , 2006)	28
Figura 6: Esquema do protocolo <i>Heatsynch</i> (adaptado de Cavalieri <i>et al.</i> , 2006)	29
Figura 7: Exemplo de um esquema do protocolo tipo com a utilização de progestagêneo (adaptado de Ambrose <i>et al.</i> , 2008)	30
Figura 8: Médico Veterinário a realizar avaliação reprodutiva de uma fêmea com auxílio de ecógrafo (fotografia original)	39
Figura 9: Protocolos utilizados no estudo, cada um utilizado em 10 vacas da exploração	41
Figura 10: Colocação de CIDR com auxílio de aplicador (fotografia original)	43
Figura 11: Observação da correcta apresentação do CIDR quando colocado no animal (fotografia original)	43
Figura 12: Recipiente de armazenamento e conservação de sémen da exploração estudada (fotografia original)	44
Figura 13: Termo de aquecimento de palhinhas de sémen da exploração estudada (fotografia original)	45
Figura 14: Pistoleio utilizado na exploração estudada (fotografia original)	45
Figura 15: Inseminação artificial realizada pelo veterinário assistente da exploração (fotografia original)	46
Figura 16: Diagnóstico de gestação positivo ao 29º dia após IA (fotografia original)	50
Figura 17: Diagnóstico de gestação positivo ao 29º dia após IA em corte longitudinal (fotografia original)	51
Figura 18: Observação dos dois cornos uterinos de uma vaca não gestante em corte transversal (fotografia original)	51

- Figura 19:** Ecografia realizada ao 29º dia após IA onde se constata morte embrionária pela ausência de embrião e pela descontinuidade da membrana amniótica (fotografia original) 51
- Figura 20:** Observação de muco translúcido no dia de inseminação das vacas do estudo (fotografia original) 53
- Figura 21:** *Chin resting*, uma das manifestações de comportamento de cio observadas na exploração durante o estudo (fotografia original) 54
- Figura 22:** Ovário (setas brancas) de vaca observado por ecografia transretal, observando-se um CL (setas pretas) com aprox. 1 cm e folículo (cabeça de seta preta) com aprox. 1 cm (fotografia original) 57
- Figura 23:** Ovário (setas brancas) observado por ecografia transretal, observando-se um folículo (cabeça de seta preta) com aprox. 2 cm (fotografia original) 57
- Figura 24:** Ovário (setas brancas) de vaca observado por ecografia transretal, observando-se um CL cavitário (setas pretas) de grande tamanho (aprox. 2 cm) (fotografia original) 57
- Figura 25:** Protocolo Syncroplus de 5 dias e com utilização de progesterona realizado pelo Dr. Alex Souza e patrocinado pela CEVA. 63

PARTE I

Fundamentação Teórica

1. Introdução

Nos últimos anos tem havido uma crescente preocupação com o manejo reprodutivo das explorações de ruminantes, quer nas explorações intensivas de leite quer nas explorações semi-extensivas de carne, embora que nestas últimas seja em menor escala.

Para corresponder a estas necessidades que devem ser fomentadas nos produtores pelos médicos veterinários assistentes das explorações, existem cada vez mais protocolos, fármacos e técnicas a fim de melhorar a performance reprodutiva, o que se traduz, em termos práticos, numa maior Taxa de Conceção (TC), menor período voluntário de espera e, consequentemente, num menor intervalo entre partos (Cavalieri *et al.*, 2006; INE, 2011).

Neste trabalho foram analisados dados de uma exploração intensiva de ruminantes bovinos de leite, avaliando o sucesso da inseminação artificial de vários protocolos reprodutivos e comparando dois destes, tentou-se realizar uma melhoria, tendo em mente que a medicina deve estar sempre em constante evolução.

1.1. Casuística do Estágio

O estudo desenvolvido neste trabalho surgiu durante a realização do estágio curricular com uma duração de 4 meses, em diversas explorações na zona do Vale do Tejo, em que acompanhei as visitas do veterinário responsável pelas mesmas. Este estágio teve maior incidência na área de bovinos embora também se tenham realizado consultas das outras espécies domésticas como observado no gráfico 1. Fizeram-se 80 visitas a explorações leiteiras e 152 a explorações de vacas de carne para diversos procedimentos médicos. Destas visitas, o âmbito da grande maioria (51 consultas) foi para manejo reprodutivo, que consistia em consultas de avaliação reprodutiva aos 45 dias pós-parto, a diagnósticos de gestação e confirmações de gestação, excluindo as consultas de urgência onde se realizaram 6 partos em vacas de leite e 5 partos em vacas de carne, 4 cesarianas em vacas leiteiras, 2 prolapsos uterinos em vacas de carne e ainda 3 avaliações reprodutivas de machos reprodutores (gráfico 2).

É de salientar que apesar de as consultas para manejo reprodutivo ainda preencherem quase metade do trabalho veterinário em explorações de leite (29 em 80 consultas), este mesmo âmbito está a aumentar de proporção e importância também nas explorações de carne (22 consultas em 152 totais).

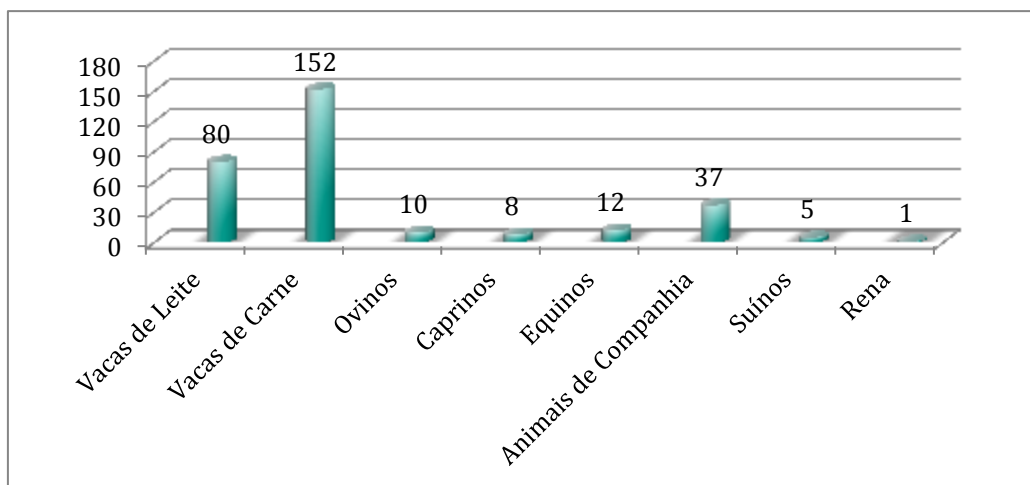


Gráfico 1: nº (número) de consultas realizadas durante o Estágio Curricular, entre Setembro e Dezembro de 2012

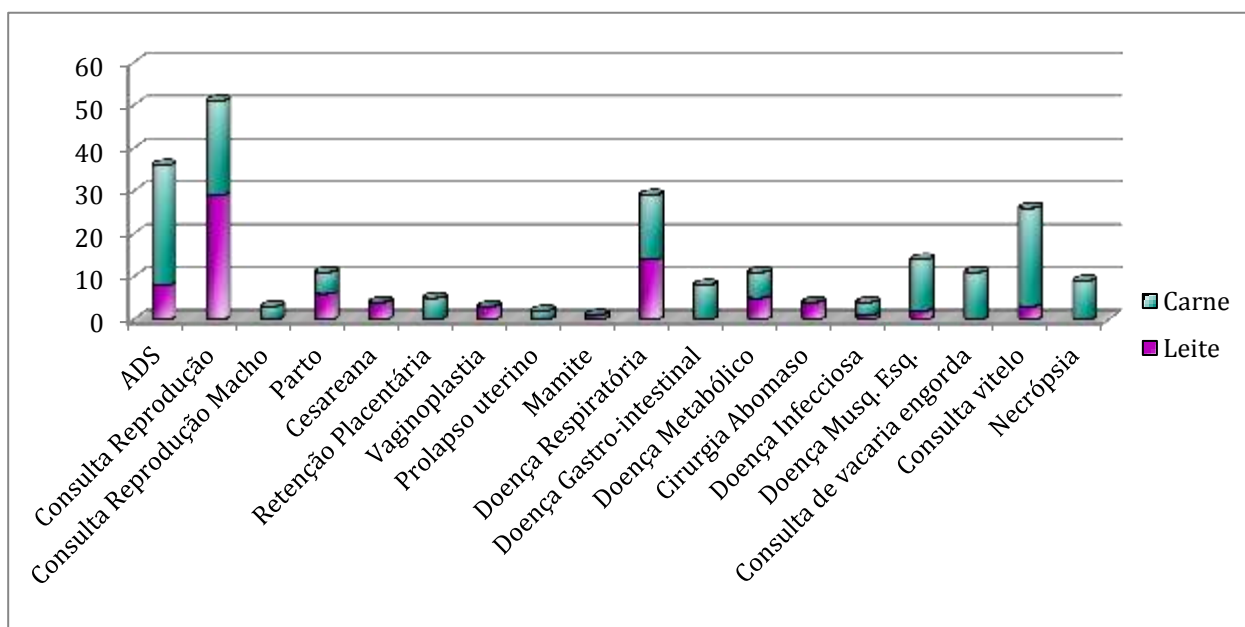


Gráfico 2: Especificação do nº e tipo de consulta realizadas em bovinos de carne e leite.
ADS: Agrupamento Defesa Sanitário que representa o número de vacinações profiláticas realizadas de acordo com os planos protocolados pelo Estado

Sendo que as consultas de reprodução ocuparam a maior percentagem de visitas do veterinário acompanhado, considerou-se importante realizar um estudo nesta área da medicina veterinária de grandes animais, até porque algumas das outras visitas, tais como partos, cesarianas, consultas para tratamento de retenções placentárias e de prolapsos uterinos, podem estar indiretamente relacionadas com este manejo reprodutivo necessário para a vida de qualquer exploração.

2. Fisiologia

As fêmeas da espécie bovina são poliétricas contínuas e como tal, apresentam ciclos reprodutivos contínuos com intervalos de mais ou menos 21 dias (19 a 23 dias), que são interrompidos em caso de gestação ou de alguma doença reprodutiva ou metabólica. Começam a sua vida reprodutiva entre os 12 ou 14 meses de idade conforme as características da própria raça ou por características individuais e nutritivas (Ball & Peters, 2004; UNAM, 2007).

Tal como nos outros mamíferos, os ruminantes desenvolvem as gónadas até há puberdade, início da vida reprodutiva e momento em que o hipotálamo liberta a GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) que irá provocar o crescimento de um ou mais folículos no ovário. Assim se iniciam os ciclos éstricos que se caracterizam pelo intervalo entre duas ovulações sucessivas (Cunningham, 2004).

O ciclo éstrico ou ciclo reprodutivo é composto por 4 fases: o proestro – período de desenvolvimento do folículo que tem uma duração de 2 ou 3 dias; o estro – período de recetividade sexual que dura 12 a 18 horas; o metaestro – período de desenvolvimento inicial do Corpo de Lúteo (CL), que passa primeiramente por uma fase de fossa ovulatória e de corpo hemorrágico, tendo uma duração de 4 a 5 dias; e o diestro – período da fase madura do CL que é a maior do ciclo éstrico, 12 a 14 dias. O animal pode ainda passar por uma fase de anestro, momento em que a ocorrência de ciclos éstricos regulares é suspensa e os folículos não se desenvolvem. O ciclo pode também ser descrito relativamente à atividade gonadal, diferenciando-se assim em fase folicular – que corresponde ao proestro e estro, e em fase lútea – que equivale ao metaestro e diestro. Esta última denominação é muito utilizada para bovinos, uma vez que através de palpação retal se consegue distinguir e diferenciar os folículos dos corpos de lúteo presentes no ovário.

3. Endocrinologia

O ciclo éstrico é controlado pelo hipotálamo e pela adenohipófise, ou *pars distalis* da hipófise, através da libertação de hormonas, desencadeando assim as várias fases do ciclo. A GnRH atua na adenohipófise e provoca o crescimento folicular através da libertação pulsátil de gonadotrofinas, como já referido. A frequência pulsátil da GnRH é maior na fase folicular devido à ausência de progesterona sendo esta variação importante para a maturação final do folículo em desenvolvimento. As gonadotrofinas libertadas então pela adenohipófise, são a hormona folículo-estimulante (FSH) e a hormona luteinizante (LH) que têm como objetivo induzir alterações num folículo até há sua rutura que se denomina por ovulação.

A FSH tem um papel predominante no crescimento folicular enquanto que a LH atua mais no momento pré-ovulatório. Os estrogénios são produzidos pelas células da granulosa da teca interna do folículo dominante, que começam a ser produzidos nesta fase do ciclo éstrico, estabelecendo-se um feedback positivo que aumenta a secreção de GnRH, o que atuando na adenohipófise, aumenta a produção LH. Esta é libertada de forma pulsátil, entrando na corrente sanguínea para estimular o processo de ovulação, criando-se de seguida o corpo de lúteo (CL), cicatriz deixada pela ovulação. As células produtoras de estrogénios transformam-se então em produtoras de progesterona que por sua vez vão atuar no útero preparando-o para uma possível gestação. O estrogénio funciona também como feedback negativo, inibindo a produção de GnRH e consequentemente a maturação de novos folículos. Ao 17º dia após a ovulação, o CL começa a regredir pela ação de uma hormona produzida pelo útero não gestante – a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Este processo denomina-se por luteólise e vai provocar uma diminuição da progesterona para níveis basais, estando assim o útero e os ovários preparados para iniciar um novo ciclo éstrico. Se ocorrer gestação, não ocorre libertação de $PGF_{2\alpha}$, mantendo-se as concentrações de progesterona altas de modo a manter a gestação viável (Ball & Peters, 2004; Cunningham, 2004; UNAM, 2007).

4. Fatores que influenciam os ciclos reprodutivos

Os fatores, tanto externos como internos, que influenciam os animais na reprodução devem ser prevenidos, uma vez que as suas consequências acabam por ser de mais difícil resolução, podendo levar a doença, geral ou reprodutiva, comprometendo o bem-estar e a eficiência dos animais. Por esse motivo, é importante conhecê-los e saber as ações a tomar para os prevenir.

Os fatores internos que afetam o ciclo éstrico estão associados principalmente à saúde do trato reprodutivo, nomeadamente do útero uma vez que este é muito suscetível de sofrer de infeções. A endometrite é um dos exemplos de doenças que afetam a fertilidade, caracterizando-se por uma inflamação do endométrio que normalmente ocorre por uma infeção bacteriana ascendente a partir da vagina. Há semelhança desta, que também pode apresentar descargas uterinas purulentas ou mucopurulentas, a piómetra é outro tipo de doença reprodutiva também frequente nos bovinos mas com a diferença de ser mais difícil o seu diagnóstico (Ball & Peters, 2004).

A nutrição é o principal fator externo que afeta a reprodução, quer diretamente, quer devido a doenças metabólicas, provocadas por uma deficiência deste mesmo fator externo. Todos os bovinos, mas principalmente as vacas leiteiras, durante a primeira parte do ciclo de lactação, encontram-se frequentemente em balanço energético negativo (BEN) uma vez que a soma da energia despendida para a sua própria manutenção e para a produção leiteira é maior que a energia consumida, sendo obrigadas a utilizar as suas reservas corporais (UNAM, 2007). A atividade ovárica normal é então suprimida até que este balanço energético seja positivo, restabelecido por uma alimentação adequada, que deve ser reforçada no período pós-parto. Este fator está diretamente relacionado com outros dois que também são importantes para o estabelecimento da gestação: o índice de condição corporal (ICC) e o índice de produção leiteira. Vacas obesas comparativamente com vacas de ICC adequado têm maior probabilidade de entrarem em BEN pois apresentam uma maior mobilização de gordura corporal, levando à acumulação de triglicéridos no fígado e, conseqüentemente, a lipidose hepática. Apesar de ainda ser controverso, há diversos autores que defendem que vacas de alta produção leiteira também podem apresentar maiores dificuldades reprodutivas uma vez que altos níveis de produção leiteira levam a uma diminuição nas concentrações plasmáticas de estrogénios, essencial para o ciclo reprodutivo, para além de também mobilizarem mais gordura na produção intensiva de leite (Lee & Kim, 2007; Ptaszynska, 2007).

A sazonalidade é um outro fator externo que merece alguma atenção principalmente devido ao stress térmico nos meses de Verão (de Maio a Setembro; Ball & Peters, 2007; Lee

& Kim, 2007) que diminui as manifestações de cio e consequentemente a fertilidade, o desenvolvimento folicular e até pode levar a morte embrionária (Alejandro *et al.*, 2014; UNAM, 2007). O fotoperíodo está relacionado com a sazonalidade pois o tempo de exposição à luz controla a ocorrência dos ciclos reprodutivos mas este fator não tem grande expressão em bovinos, verificando-se mais em cabras e ovelhas (UNAM, 2007).

A definição de stress, segundo Dobson & Smith (2000), traduz-se na incapacidade de um animal se adaptar ao ambiente que o rodeia, verificando-se que não atinge todo o seu potencial genético, quer na taxa de crescimento, produção de leite, resistência a doenças ou na taxa de fertilidade. Não só o stress térmico mas também a manipulação e as interações homem-animal podem afetar a fertilidade (Lee & Kim, 2007) atuando diretamente na libertação de GnRH e de LH e consequentemente no crescimento folicular, e indiretamente na produção de estrogénios pelo ovário (Dobson & Smith, 2000).

5. Detecção de cio

O estro, intervalo de tempo em que a vaca permite a cópula, dura entre 12 a 18 horas mas apesar disso, as manifestações comportamentais de cio podem ocorrer antes, durante e depois desta fase sem estarem diretamente relacionadas com o momento da ovulação. Assim, são apenas um indicador para uma vigilância mais apertada destes animais, a fim de perceber em que fase do ciclo reprodutivo se encontram, para depois se poder realizar os procedimentos que mais se adequam à exploração, sempre com o objetivo último de ter as vacas gestantes num menor período de tempo (Cunningham, 2004).

As manifestações de cio são muito variadas e podem ser muito exuberantes ou discretas. Através da observação direta, a única manifestação fiável é a imobilização do animal para ser montado quer pelo macho ou por outras fêmeas (Ball & Peters, 2004). Há ainda outras manifestações complementares, tais como o montar outras vacas ou apenas descansar o queixo (*chin resting*) em cima das companheiras, inquietação, vocalizações, uma maior interação com os outros animais, tal como agressividade, falta de pelo na base da cauda devido a ter sido montada (figura 1) e fazer ou ser sujeita por outra à reação de Flehmen. Acontecem não apenas alterações comportamentais mas também físicas, sendo estas, o aumento da secreção de muco no cérvix e na vagina, observando-se por vezes uma descarga de muco translúcido pela vulva, principalmente quando a fêmea é palpada. Verifica-se um aumento da temperatura corporal, uma redução na produção de leite e observa-se ainda a vulva edemaciada e com uma cor mais avermelhada que o habitual (figura 2; Ball & Peters, 2004; Noakes *et al.*, 2009; Selk, 2002).



Figura 1: Ausência de pelo na base da cauda de vaca que indica que esta esteve em cio e foi montada por outra ou por um macho (fotografia original)



Figura 2: Vulva de vaca edemaciada e avermelhada devido à manifestação de cio (fotografia original)

Uma detecção eficiente do cio é definida numa percentagem de possíveis manifestações de cios observados num determinado período de tempo (taxa de detecção de cio). Este valor é uma estimativa sobre a eficiência de detecção de cio numa determinada exploração, para assim se determinar se os métodos utilizados são os mais adequados ou não. Para que este valor seja o mais fiável possível, e uma vez que o principal método utilizado é a observação real da ocorrência, todas as vacas devem estar bem identificadas, bem alimentadas e saudáveis e deve promover-se a interação entre elas, para que o funcionário responsável por esta tarefa possa proceder à detecção de cios no período de tempo determinado para tal. Este deve ter ainda noção da responsabilidade deste trabalho, sendo-lhe proporcionada a formação necessária (Noakes *et al.*, 2009). É difícil estipular um tempo ideal fixo para a detecção de cios mas deve-se desenvolver uma estratégia tendo em consideração alguns pressupostos: vacas em cio podem ser montadas com intervalos de 15 a 20 minutos pelo que a duração de observação tem de ser maior que esse intervalo; há uma tendência de um maior número de montas ao fim da tarde e noite pelo que uma observação entre as 20 horas e as 22 horas é importante (Ball & Peters, 2004); promover a movimentação dos animais, quer pela colocação da alimentação, quer quando são conduzidos para a ordenha, também proporciona a interação entre eles (Ball & Peters, 2004; Noakes *et al.*, 2009). Contudo, se os animais estiverem mal nutridos, vão dar mais atenção aos alimentos, não expressando comportamentos de cio nesse momento, pelo

que se deve ter em consideração todos estes fatores quando for estipulado o plano para cada exploração individualmente (Selk, 2002).

Para além da observação, deve-se complementar a deteção de cios com outras técnicas existentes. A marcação da base da cauda é um método simples e económico de perceber se a vaca foi montada e quais andam a montar. Se a tinta desaparecer, significa que esse animal foi montado e que, portanto, pode estar em cio, devendo-se depois confirmar os sinais físicos de cio. Este método não é aconselhado se os animais estiverem em campo, estando sujeitos às questões meteorológicas que podem apagar a tinta (Noakes *et al.*, 2009).

Os animais detetores de cio são machos vasectomizados ou fêmeas androgenizadas que potenciam a atividade sexual no efetivo. Quantos mais animais estiverem em estro, mais montas irão existir por cada um destes animais devido ao incremento do efeito macho, podendo ser esta uma mais valia para a exploração apesar de ter os inconvenientes de gastos de alimentação e da cirurgia para este animal, bem como de questões de bem-estar animal (Noakes *et al.*, 2009; Selk, 2002).

Uma técnica não muito conhecida devido aos seus custos em laboratório é a medição da resistência elétrica dos fluidos vaginais. Esta resistência diminui no estro mas como é variável de animal para animal, é necessário fazer várias medições até se perceber quando este decresce e sempre individualmente o que nem sempre é rentável na prática corrente (Ball & Peters, 2004; Noakes *et al.*, 2009).

Por outro lado, uma das técnicas auxiliares mais utilizada em Portugal é o podómetro, um detetor de movimento que consiste num aparelho eletrónico que mede os passos por hora de cada animal, determinando assim se está mais inquieto ou não, característica conhecida e muito estudada dos animais em cio. Este sistema também funciona por comparação da atividade diária de cada vaca, sendo necessário um tempo de utilização prévio antes de serem valorizadas as medições (Ball & Peters, 2004; Noakes *et al.*, 2009).

Há ainda fatores externos, tais como ambientais, nutricionais e locomotores, que influenciam as manifestações de cio. O tipo de estábulo é importante na medida em que os animais num local amplo têm mais propensão para manifestar cio do que em espaços mais pequenos. O piso é também um fator importante: a sua composição deve ser aderente, duro e deve estar limpo, promovendo a monta e movimentação dos animais. Os problemas locomotores, e em particular os problemas podais, tais como a laminite, são um problema muito comum nas explorações intensivas. Para além de todas as restrições diretamente relacionadas com esta doença, as expressões de cio também vão estar diminuídas na sua presença.

Os grupos que são formados com os animais influenciam as manifestações de cios. Quanto mais animais se encontrarem em cio, maior a frequência e intensidade das suas manifestações.

A temperatura ambiente é um outro fator que influencia as manifestações de cio devendo estar no intervalo de conforto dos bovinos, nunca superior a 30° C. Este é um fator importante no nosso país, e por isso se valoriza tanto o modelo das instalações que albergam os animais, bem como os métodos de arrefecimento das mesmas. Em climas frios, os animais tendem a mostrar mais atividades de monta enquanto que em climas quentes, tendem a mostrar mais sinais secundários, tais como o descansar do queixo ou a interação com os outros.

Como já referido neste trabalho, a alimentação é um fator importante com impacto na ciclicidade ovárica. Se as vacas estiverem em BEN, há um atraso nas exibições de cio após o parto. Também a média de produção diária de leite está relacionada com as expressões de cio, sendo que os animais de mais alta produção expressam-se num menor período de tempo e em menor percentagem quando comparados com os animais de baixa produção. Por isso, os animais de média produção de leite são os que melhor apresentam cio e durante mais tempo, devendo-se por isso apostar nestes animais (Noakes *et al.*, 2009).

6. Ecografia

Com o avanço da tecnologia e com o desenvolvimento da ultrassonografia em bovinos, descobriu-se, e cada vez mais se apura com precisão, os momentos fisiológicos ideais para a realização de certos tratamentos reprodutivos bem como se realizam, com maior facilidade, outros tratamentos médicos (Merck, 2007). Os benefícios de um diagnóstico mais preciso justificam o custo do equipamento e o treino que o operador necessita para que se realize um bom trabalho (DesCôteaux *et al.*, 2010).

Esta técnica utiliza ondas sonoras, ou como o próprio nome indica, ultrassons, emitidos por cristais piezoelétricos instalados na sonda e que através de um feixe, penetram os tecidos de diferentes densidades sendo refletidos de maneira diferente conforme esta densidade e captados novamente pela sonda. Estas ondas refletidas, também denominadas de ecos, são convertidas em sinais elétricos que serão amplificados e digitalizados para se tornarem em sinais digitais, visíveis num monitor através de uma escala de cinzentos com 16, 64 ou 256 tonalidades, que possibilita a identificação das estruturas ecografadas pelo manipulador (DesCôteaux *et al.*, 2010; Merck, 2007).

Existem três tipos de sondas classificadas segundo as suas características e segundo a imagem que fornecem. As sondas lineares contêm um grande número de cristais alinhados num eixo longitudinal que pode medir entre 5 a 15 cm. Estas originam uma imagem retangular com uma largura constante, suficiente para visualizar toda a zona onde a sonda toca. As sondas convexas permitem a visualização de uma zona mais alargada uma vez que têm os cristais dispersos numa superfície convexa. Apesar de estas terem uma superfície mais reduzida, a imagem gerada expande com a profundidade de penetração o que permite a observação de estruturas mais profundas e também através de uma janela mais pequena. Por fim, as sondas setoriais mecânicas contêm um menor número de cristais produzindo uma imagem em forma de leque, tal como as sondas convexas que mostra uma imagem expandida em profundidade mas com uma janela à superfície ainda menor que estas, que é utilizada, por exemplo, na observação através do espaço inter-costal. A desvantagem desta é uma menor resolução em campos mais próximos (DesCôteaux *et al.*, 2010).

As sondas lineares são as mais utilizadas no exame transretal de bovinos, podendo-se observar assim todo o aparelho reprodutivo. Podem-se utilizar diferentes frequências sendo que esta característica implica a quantidade de cristais oscilantes por segundo, e lê-se em Megahertz (MHz). Em medicina, são utilizadas frequências desde os 2 aos 10 MHz, sendo que quanto maior for a frequência, menor será a profundidade de penetração nos tecidos, mas maior será a resolução espacial, quer lateral quer axial (DesCôteaux *et al.*, 2010).

7. Protocolos de sincronização

Para facilitar o uso da IA e para reduzir o trabalho e tempo despendidos para a detecção de cios, tem-se utilizado a sincronização dos ciclos reprodutivos na indústria dos ruminantes, não só em bovinos mas também em ovelhas e em menor escala nos caprinos. O controle farmacológico do ciclo éstrico compreende a sincronização do desenvolvimento folicular, da regressão do CL (Corpo de Lúteo) e/ou da ovulação. Mas para evitar a sobredosagem de medicamentos que também detém custos elevados, criaram-se vários protocolos a fim de aproveitar e potencializar os efeitos dos fármacos usados (Cavalieri *et al.*, 2006). Esses protocolos aumentam a taxa de prenhez por aumentarem o número de inseminações, mas não aumentam necessariamente a TC (Taxa de Conceção; Sartori, 2006). Os protocolos de sincronização de cio dependem da eficiência e da precisão da detecção de cios praticada na exploração, mas como já referido, esta eficiência e precisão é variável e depende de vários fatores tais como o ambiente, o manejo e o próprio animal (Santos *et al.*, 2003).

Os vários métodos de sincronização podem resumir-se na utilização de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) para indução da luteólise, manipulação da função folicular e da função lútea com o auxílio de gonadotrofinas (GnRH, eCG, etc), e a simulação da função do CL através da administração de progesterona ou de um dos seus derivados sintéticos (Ball & Peters, 2004).

7.1. Prostaglandina

A $PGF_{2\alpha}$, ou os seus análogos sintéticos (como por exemplo, dinoprost), já são usados para regular o ciclo éstrico há cerca de 50 anos e têm como principal mecanismo a indução da luteólise. Para isso acontecer, é necessário a presença de um CL responsivo a esta hormona, o que coincide normalmente com os dias 5 a 17 do ciclo éstrico nos bovinos e que acarreta uma queda consequente das concentrações de progesterona (Cavalieri *et al.*, 2006). Depois disso, ocorre um aumento da secreção de gonadotrofinas e de estradiol e, dependendo do estado de maturação dos folículos já existentes, pode ocorrer manifestação de comportamentos de cio e ovulação (Ball & Peters, 2004). Vacas com folículos maduros entram em cio mais rápido que vacas com folículos imaturos (Cavalieri *et al.*, 2006) uma vez que esta hormona não tem efeito no desenvolvimento folicular. Assim, os animais irão entrar em cio em diferentes dias, tendo este protocolo pouca precisão no momento da ovulação e da inseminação (Ball & Peters, 2004; Santos *et al.*, 2003).

A sua administração pode ser realizada num modelo de dose única (Figura 3a) que requer a detecção prévia de um CL no animal. Para isto, é necessário a realização de palpação retal, o que tem a desvantagem de ser demorado e ser necessário a presença de uma pessoa

especializada, ou o doseamento de progesterona no leite que também acarreta custos quer na própria análise, quer custos logísticos. Este método exige ainda uma cuidada deteção de cio durante 3 a 5 dias, inseminando-se o animal quando ocorre a sua observação (Ball & Peters, 2004).

Contudo, é possível realizar este modelo sem se conhecer o estado cíclico da vaca e, por isso, reduzindo as desvantagens referidas. Continua a ser necessário uma deteção de cio cuidada durante 5 a 7 dias, assinalando e inseminando os animais que o demonstram. Após este tempo administra-se uma dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ aos animais que não o apresentaram e continua-se a observação de cio, esperando que este aconteça dentro de 3 a 5 dias (Figura 3b). Este segundo método tem a vantagem de ter um custo muito reduzido mas carece de um tempo de deteção de cio mais longo (Cavalieri *et al.*, 2006).

O protocolo com a administração de duas doses de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Figura 3c) assegura que um maior número de vacas seja responsivo à hormona e que assim entrem em cio num determinado período de tempo mais curto, necessitando sempre da deteção de cio que acaba por ser um dos maiores problemas nas explorações. Como tal, para contornar este problema, pode-se realizar este mesmo protocolo mas com Inseminação Artificial a Tempo Fixo (IATF) entre as 72 e 96 horas após a segunda dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Figura 3d) (Ball & Peters, 2004; Cavalieri *et al.*, 2006).

Com a administração de prostaglandina, pode-se ainda realizar o protocolo “Targeted breeding” (Figura 3e) que foi desenhado para grandes explorações pela sua facilidade logística, uma vez que os tratamentos são realizados no mesmo dia da semana, facilitando a manipulação dos animais. Realizam-se duas ou três administrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ separadas por 14 dias e realiza-se deteção de cio durante esse período. Os animais que não sejam detetados em cio são, então, inseminados entre as 72 e 80 horas após a última administração da hormona (Cavalieri *et al.*, 2006).

Antes de qualquer protocolo reprodutivo, é possível a realização de uma pré-sincronização através da administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$, obtendo-se a vantagem de começar o protocolo propriamente dito no momento ideal, ou seja, entre os dias 5 e 10 do ciclo éstrico. Esta pré-sincronização consiste em duas administrações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ separadas por 14 dias, sendo que a última dose deve ser num intervalo de 12 a 14 dias para o início do protocolo a realizar (Cavalieri *et al.*, 2006). Este modelo permite aumentar a taxa de prenhez e minimizar o número de vacas que entram em cio antes do término do protocolo (Santos *et al.*, 2003).

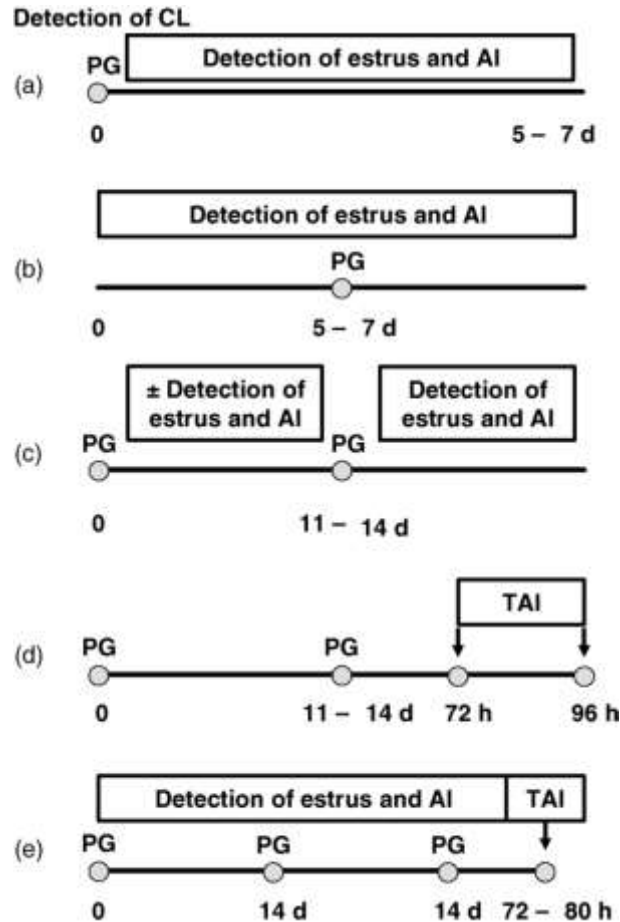


Figura 3: Tipos de protocolos de sincronização de cio que utilizam a prostaglandina (adaptado de Cavalieri *et al.*, 2006). (a) Protocolo de dose única na presença de CL. (b) Protocolo de dose única sem conhecimento do estado cíclico da vaca. (c) Protocolo de duas doses com detecção de cio. (d) Protocolo de duas doses com IATF. (e) Protocolo "Targeted breeding". CL: Corpo de Lúteo. PG: Prostaglandina. AI: Artificial Insemination (Inseminação Artificial). d: dias. TAI: Timed Artificial Insemination (Inseminação Artificial a Tempo Fixo). h: horas.

Em Portugal, estão disponíveis para administração em vacas várias fórmulas desta hormona. Utilizando o princípio ativo *dinoprost* encontram-se no mercado dois medicamentos: Dinolytic[®] do laboratório Zoetis e Enzaprot t[®] da CEVA. Ambos têm uma concentração de 5 miligrama (mg) do princípio activo por mililitro (ml) da solução final e deve-se administrar por cada animal 5 ml desta. Existe também o medicamento Estrumate[®] da Intervet e Cyclix[®] da Virbac que estão sob a forma ativa de *cloprostenol sódico* numa concentração de 250 microgramas (µg) por ml e administra-se 2 ml por vaca em ambos. Com outro princípio ativo, o *alfaprostol*, encontramos o medicamento da CEVA Gabbrostim[®] a 2 mg/ml, devendo ser aplicada uma dose de 0,75 ml por 100 quilograma (kg) de peso vivo do animal. Ainda semelhante a este, temos o princípio ativo (+)-*Cloprostenol* no medicamento Genestran[®] a 75 µg/ml da Vetlima; da Hipra encontramos no mercado o Gestavet-prot[®] a 75 µg/ml com o princípio ativo *dexcloprostenol* e da Calier o medicamento Veteglan a 0,075

mg/ml com o princípio *d-cloprostenol*. Estes três últimos medicamentos devem ser administrados numa dose de 2 ml de solução por animal e todos devem ser administrados via intramuscular com uma seringa e agulha esterilizadas (Apifarma/CESA, 2007).

7.2. Ovsynch

Os protocolos mais utilizados em IATF são os que se baseiam no protocolo *Ovsynch* uma vez que são protocolos de sincronização da ovulação, aumentando a precisão desta, para que assim se saiba qual o momento ideal para inseminar, sem ser necessário a detecção de cio (Santos *et al.*, 2003; Cavalieri *et al.*, 2006).

O protocolo *Ovsynch* (figura 4) consiste numa injeção de GnRH ao dia 0 que resulta num pico de LH e consequentemente em ovulação, iniciando-se também o recrutamento de um novo folículo. Esta ação só acontece quando o folículo dominante é responsivo à LH devido à presença de recetores nas células granulosas que se desenvolvem quando os folículos têm mais de 10 mm de diâmetro. Após 7 dias, administra-se uma injeção de PGF_{2α} que exerce uma ação luteolítica sobre o CL que entretanto se desenvolveu, seguindo-se após 48 horas outra administração de GnRH (Ball & Peters, 2004; Santos *et al.*, 2003). Esta segunda administração de GnRH serve para sincronizar a ovulação através da libertação de LH, conduzindo ao pico pré-ovulatório desta hormona e que decorre entre 24 a 32 horas após a administração. Como tal, a IA é aconselhada entre as 12 e as 16 horas após a última administração de GnRH, ou seja, a tempo fixo. Contudo, durante este período de tempo, está descrito que 10 a 15 % dos animais podem apresentar sinais de cio, que no caso de ser detetado, podem ser inseminados nesse momento pois é quando apresentam uma taxa de prenhez maior (Santos *et al.*, 2003).

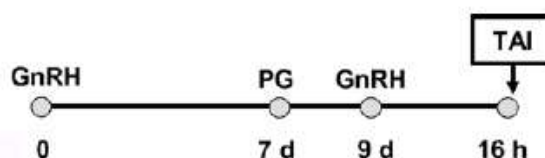


Figura 4: Esquema de protocolo *Ovsynch* (adaptado de Cavalieri *et al.*, 2006). GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormone. PG: Prostaglandina. TAI: Timed Artificial Insemination (Inseminação Artificial a Tempo Fixo). d: dias. h: horas.

A maximização do protocolo de *Ovsynch* é conseguida quando, ao administrar a primeira injeção de GnRH, ocorre a ovulação, para que quando se administrar a PGF_{2α} haja um CL responsivo a esta hormona. Para conseguir isso, pode-se realizar uma pré-sincronização com o auxílio de prostaglandinas, como já foi referido (Santos *et al.*, 2003).

O GnRH está disponível em Portugal sob a forma de *gonadorelina* nos medicamentos Ovarelin[®] da CEVA numa concentração de 50 µg/ml e em Fertagyl[®] da Intervet a 0,1 mg/ml. Estes têm uma dose de administração de 2 ml/animal e de 5 ml/animal, respetivamente. O princípio ativo *buserelina* também é utilizado para este fim nos medicamentos Veterelin[®] da Calier e Busol[®] da Vetlima, ambos com uma concentração de 0,004 mg/ml e devendo ser administrado 2,5 ml da solução. Derivado deste princípio ativo, podemos ainda encontrar o Receptal[®] (*acetado de buserelina*) numa concentração de 0,004 mg/ml do laboratório Intervet e com uma dose individual de 2,5 ml/animal. Todos estes têm a indicação de administração intra-muscular (Apifarma/CESA, 2007).

7.3. Cosynch

Uma das modificações mais simples ao protocolo *Ovsynch* é o protocolo denominado por *Cosynch* e que apenas altera o momento de IA (figura 5). Esta é realizada juntamente com a última dose de GnRH, que ocorre entre 48 a 72 horas após a administração de PGF_{2α}. A vantagem na utilização deste protocolo prende-se com a diminuição de uma manipulação dos animais relativamente ao protocolo *Ovsynch*, que torna a sua aplicação mais fácil e que também diminui a necessidade de mão-de-obra, logo reduz os custos logísticos. As taxas de conceção obtidas com este protocolo são semelhantes ao protocolo *Ovsynch* ou ligeiramente inferiores, mas apesar disso deve ser um protocolo a considerar em vacas de difícil manejo, como por exemplo, as vacas de carne (Ptaszynska, 2007; Taponen, 2009).



Figura 5: Esquema de protocolo *Cosynch* (adaptado de Cavalieri *et al.*, 2006). GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormone. PG: Prostaglandina. TAI: Timed Artificial Insemination (Inseminação Artificial a Tempo Fixo). d: dias.

7.4. Heatsynch

Existe ainda o protocolo *Heatsynch* amplamente usado nos Estados Unidos da América mas proibido na Europa e, consequentemente, em Portugal, devido à utilização de um análogo do estradiol [estradiol cypionate (ECP) ou estradiol benzoate (EB)] em vez de GnRH, na segunda administração (figura 6; Cavalieri, 2004; Santos *et al.*, 2003). Estas hormonas têm a vantagem de provocar um pico de LH mais prolongado do que o GnRH,

mesmo em concentrações baixas de progesterona circulante (Cavalieri, 2004; Ptaszynska, 2007). O horário da IA, que deve ser entre as 24 e as 48 horas após a administração do estradiol, também se considera uma vantagem quando comparado com o protocolo *Ovsynch*, em que são necessárias várias manipulações dos animais no mesmo dia. A proporção da manifestação de sinais de cio é maior quando aplicado o protocolo *Heatsynch* comparado com os outros protocolos, o que se torna a maior vantagem encontrada, uma vez que está previsto a detecção de cio e a IA ao longo de 3 dias, mesmo sendo um protocolo que se possa realizar com IATF (Santos *et al.*, 2003).

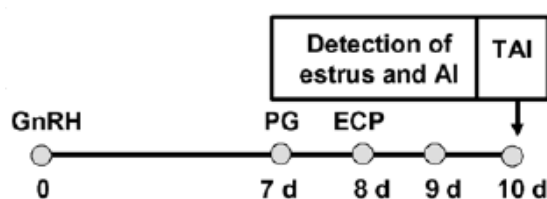


Figura 6: Esquema do protocolo *Heatsynch* (adaptado de Cavalieri *et al.*, 2006). GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormone. PG: Prostaglandina. ECP: Estradiol Cypionate. AI: Artificial Insemination (Inseminação artificial). TAI: Timed Artificial Insemination (Inseminação Artificial a Tempo Fixo). d: dias.

7.5. Progesterona

Um dos problemas com os protocolos de sincronização de cio que combinam o recrutamento de um novo folículo e a regressão do CL, é a luteólise prematura, ocorrendo cio sem que este seja detetado e, conseqüentemente, ovulação antes do tempo de inseminação pré-estipulado pelo programa. Para contornar este problema, desenvolveram-se dispositivos de liberação de progesterona que mantêm as concentrações plasmáticas desta hormona elevadas, mesmo na ausência de CL, suprimindo a liberação de GnRH e impedindo o pico de LH (Ball & Peters, 2004; Santos *et al.*, 2003).

O uso de progesterona tem também a função de sensibilizar e induzir a formação de um CL de duração normal e de aumentar a frequência de liberação de LH pulsátil para permitir o desenvolvimento do folículo dominante em vacas em anestro. A taxa de sucesso do uso de progestagêneos neste tipo de animais, depende do intervalo de tempo que tenha decorrido desde o parto, da condição corporal de cada indivíduo e de outras causas de anestro, como doenças reprodutivas ou sistêmicas, que devem sempre ser detetadas e tratadas antes do uso destes protocolos, de modo a evitar tratamentos que há partida já sabemos que não terão sucesso (Ptaszynska, 2007).

Os protocolos à base de progesterona têm sido desenvolvidos ao longo do tempo ocorrendo modificações quer no formato dos dispositivos e na quantidade de progesterona

com que estes são impregnados, bem como na duração dos próprios protocolos e nas associações hormonais que se realizam (Cavalieri *et al.*, 2006).

Para bovinos, os dispositivos mais comuns encontrados em Portugal são o CIDR[®] da Zoetis, o PRID[®] *alpha* e o PRID[®] *delta* da CEVA que são dispositivos vaginais de libertação de progesterona, sendo que o primeiro tem a forma de T e contém 1,38 g de progesterona e os da CEVA contêm 1,55 g de progesterona, onde o PRID[®] *alpha* tem uma forma elíptica e o *delta* tem a forma de triângulo (DGAV, 2009). Cavalieri *et al.* (2006) afirma que o design dos dispositivos é importante uma vez que observou a existência de maiores concentrações séricas de progesterona quando utilizado os dispositivos com uma maior superfície exposta. É importante também salientar que as concentrações plasmáticas vão diminuindo quanto maior for o tempo de inserção de um dispositivo e que variam, ainda, de animal para animal, comprovando-se que vacas cíclicas têm maiores taxas de concepção (Ambrose *et al.*, 2008) e havendo evidências de que o mesmo acontece em vacas núlparas (Cavalieri *et al.*, 2006).

O protocolo típico (Figura 7) consiste na colocação do dispositivo intra-uterino juntamente com a administração de GnRH no dia 0, para recrutar uma nova onda folicular e impedir que se formem folículos persistentes causando a atresia ou ovulação destes com a administração desta hormona (Madureira *et al.*, 2004). O uso do dispositivo de progesterona deve ser limitado a um tempo de 7 ou 9 dias, realizando-se então uma administração de PGF_{2α} 24 horas antes da retirada do mesmo, esperando-se cio 36 a 60 horas após a remoção do dispositivo. Espera-se que com este protocolo 80 % do efetivo entre em cio (Hittinger *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2003). Pode-se administrar também 24 horas após a remoção do CIDR uma dose de GnRH para realizar a IATF entre as 16 e 20 horas após desta última, eliminando o problema recorrente da observação de cios.

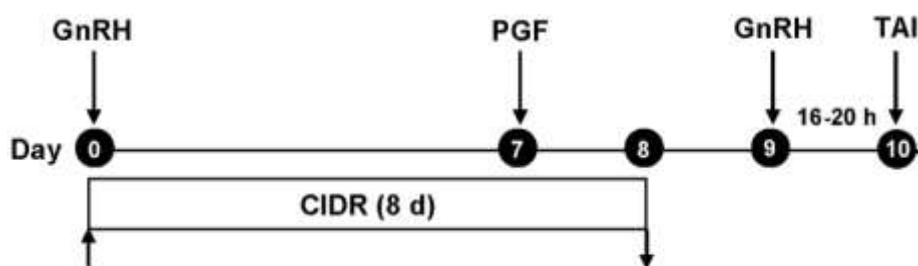


Figura 7: Exemplo de um esquema do protocolo tipo com a utilização de progestagénio (adaptado de Ambrose *et al.*, 2008). GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormone. PGF: Prostaglandina F_{2α}. h: horas. TAI: Timed Artificial Insemination (Inseminação Artificial a Tempo Fixo). CIDR: Controlled internal drug releaser. d: dias.

7.6. Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)

A hCG é uma hormona natural humana, com uma atividade folículo-estimulante semelhante à da LH, que se liga aos recetores desta provocando a ovulação do folículo dominante. Esta ação cria um CL acessório que faz aumentar a quantidade de progesterona plasmática circulante, aumentando assim a sobrevivência do embrião, caso a ovulação tenha sido fecundante, aumentando também, em última análise, a taxa de concepção (Santos *et al.*, 2001). Além deste aumento na indução de CL adicionais, pensa-se que a hCG também forneça um suporte de LH, resultando na ovulação do folículo dominante (Ptaszynska, 2007).

Tendo em mente estas duas ações da hCG, estão descritos dois métodos de utilização distinta para esta hormona. Santos *et al.* (2001) descreve que a utilização de 3300 Unidade Internacional (UI) numa injeção intramuscular 5 dias após a IA, tem a capacidade de aumentar a secreção de progesterona no início da gestação, reduzindo o número de perdas embrionárias. O mesmo autor, concluiu também que vacas de alta produção, devido ao seu metabolismo acelerado no consumo de progesterona, bem como vacas com baixa condição corporal na altura da monta, têm uma maior resposta a este tratamento, uma vez que são as que têm uma maior probabilidade de problemas na manutenção da gestação (Santos *et al.*, 2001; Ptaszynska, 2007). Por outro lado, tem-se estudado o uso de hCG em detrimento da Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG), estando descrita a sua administração no dia em que se administra também a hormona PGF_{2α} nos protocolos com progestagêneos (Simões & Valentim, 2007). Estudos indicam que a hCG também se pode usar em substituição de GnRH que tem uma duração menor de exposição ao LH e que por isso, a hCG vai ter uma ação mais eficaz (Ptaszynska, 2007).

Em Portugal, encontra-se disponível o fármaco Chorulon[®] da MSD Animal Health, numa concentração de 1500 UI sendo que a dose recomendada varia conforme o objetivo do tratamento podendo ir de 1500 (5 ml) a 5000 UI (Apifarma/CESA, 2007; DGAV, 2009).

7.7. Gonadotrofina coriônica equina (eCG)

A eCG ou PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) é uma complexa glicoproteína de alto peso molecular e de meia vida longa (3 dias), produzido no endométrio da égua entre os 40 e os 130 dias de gestação. Quando utilizado em bovinos, liga-se aos recetores foliculares da FSH e da LH e aos recetores da LH no CL (Baruselli *et al.*, 2004; Sá Filho & Vasconcelos, 2011), promovendo o crescimento final do folículo dominante e a síntese de estrogénios, levando mesmo ao aumento da progesterona circulante através da criação de um CL pela ovulação do mesmo folículo dominante (Baruselli *et al.*, 2012; Sá

Filho & Vasconcelos, 2011). Pode ainda ser utilizada em dose única de protocolos para superovulação e em vacas recetoras de embriões nos protocolos de transferência de embriões (Baruselli *et al.*, 2004).

No entanto, o uso de eCG em protocolos de IATF é controverso, aparecendo resultados positivos e negativos no uso desta hormona. Baruselli *et al.* (2008) conclui que esta diferença se deve ao estado cíclico em que as vacas tratadas se encontram, sendo que em vacas cíclicas não há aumento na TC, pelo que a eCG não tem aplicação neste grupo de animais. Por outro lado, ocorre um incremento na TC com a utilização de eCG, quanto maior for a intensidade do anestro. Este autor propõe ainda que estes resultados se devem à ausência de pulsos de LH adequados, que iriam estimular o crescimento do folículo dominante e a criação de condições ideais para a ovulação. Isto justifica que em vacas que apresentam condições fisiológicas adequadas para a libertação normal de LH, não se detete melhoria com o uso de eCG (Baruselli *et al.*, 2008). Há um outro estudo que contribui para a controvérsia do uso de eCG, uma vez que indica que o uso repetido desta hormona, num espaço de tempo inferior a um ano, pode aumentar o aparecimento de anticorpos, que levam a uma diminuição da fertilidade nos animais (Simões & Valentim, 2007), teoria também estudada por Baruselli *et al.* (2012) que contraria os resultados de Simões & Valentim (2007), pois não se verifica esta diminuição, embora tenham obtido diferentes resultados de acordo com a raça dos animais.

O protocolo mais utilizado é o associado com um dispositivo libertador de progesterona, administrando-se o eCG na retirada do dispositivo. Se por si só, o progestagénio já tem a capacidade de induzir ciclicidade em vacas em anestro, a administração de eCG aquando da remoção deste, estimula ainda mais a maturação folicular e a ovulação, tendo-se verificado um aumento no diâmetro do folículo dominante (Baruselli *et al.*, 2008; Ptaszynska, 2007). A associação da eCG a um protocolo reprodutivo deve ser uma opção de escolha quando se pretende tratar vacas em anestro, com baixa condição corporal ou quando se pretende iniciar precocemente a ciclicidade da vaca após o período pós-parto (Madureira *et al.*, 2004).

Em Portugal, existe o fármaco Intergonan[®] com uma concentração de 6000 UI da farmacêutica Intervet. Para o protocolo referido, deve-se utilizar uma dose de 2 a 4 ml da solução reconstituída (Apifarma/CESA, 2007; DGAV, 2009).

8. Inseminação Artificial (IA)

Para realizar uma correta inseminação artificial é necessário não só conhecer todos os procedimentos técnicos, mas também toda a anatomia da vaca para perceber onde se deve depositar o sémen e qual o momento ideal. Nos primórdios do desenvolvimento da IA existia uma grande controvérsia sobre este mesmo assunto, tendo sido realizados vários estudos e concluindo-se que o local que apresenta uma maior fertilidade é o corpo uterino, devendo ser este o local alcançado para uma boa inseminação (O'Connor & Peters, 2003). Quanto ao momento de inseminação, defende-se que os espermatozóides necessitam de algum tempo no trato reprodutivo feminino para serem capazes de fertilização do óvulo, denominando-se este acontecimento por capacitação. Por isso, devem-se inseminar as fêmeas antes da ocorrência da ovulação, no último terço do cio, que se traduz em 12 a 18 horas após o início das manifestações de cio (Selk, 2002). Contudo, uma técnica bem executada não implica apenas a deposição do sémen mas todo o procedimento de preparação que deve ser realizado com preceito, não esquecendo nenhum dos passos (O'Connor & Peters, 2003).

Deve-se atender à manipulação e armazenamento do sémen e saber como o realizar. O tanque de armazenamento de sémen é de metal e tem a forma de um largo garrafão, selado com uma tampa. Por este motivo, tem a capacidade de manter uma temperatura de -196°C (temperatura do nitrogénio líquido) durante um período de 6 a 9 meses. Para aguentar esta duração, é necessário mantê-lo em boas condições, num local limpo, seco e bem ventilado para prevenir intoxicações por inalação do nitrogénio que eventualmente possa evaporar. Por outro lado, a fim de diminuir esta evaporação, o local de armazenamento do mesmo não deve estar junto de correntes de ar, em contacto com a luz solar direta, sofrer excessivos movimentos nem estar em pisos húmidos de modo a evitar a corrosão (Selk, 2002).

Quando se pretende realizar uma IA, deve-se primeiramente confirmar se a vaca está realmente em cio, verificando os vários sinais físicos (muco viscoso e translúcido, vulva edemaciada e rosada; figura 2). Deve-se realizar uma adequada contenção do animal e desenvolver uma adequada técnica sanitária na preparação do material de inseminação: os pistoleiros devem ser mantidos limpos e secos depois de cada utilização; os materiais utilizados para lubrificação do reto não devem entrar em contacto com a vulva pois geralmente são espermicidas (O'Connor & Peters, 2003).

Na preparação de uma dose de sémen para inseminar uma vaca, é necessário ter todo o material necessário preparado para minimizar os danos causados pelo choque térmico no sémen. Este material consiste no tanque de armazenamento com as palhinhas do sémen, os pistoleiros, as bainhas descartáveis, o banho-maria com termómetro, pinça e papel absorvente.

Deve também existir um inventário com a localização de cada dose de sémen no tanque. O tanque divide-se em canisters que estão identificados por números e que se devem elevar apenas até ao meio do tanque (região do pescoço) para que as outras palhinhas não percam a temperatura de conservação. De seguida, usa-se a pinça para retirar a palhinha e imediatamente deve-se baixar o canister, fechando o tanque. Este processo não deve demorar mais que 8 a 10 segundos e se tal acontecer deve-se baixar o canister mesmo sem a tarefa concluída, para que este possa recuperar a temperatura e só passado algum tempo, voltar a levantá-lo (Selk, 2002). O limite crítico de temperatura é -80°C e os danos causados no sémen dependem da duração a que esteve exposto acima desta temperatura, sendo esses danos a recristalização que altera a qualidade do sémen (Hopkins & Evans, 2003).

Depois de retirar a palhinha do tanque de armazenamento, deve-se colocá-la em banho-maria a uma temperatura de 35°C e aguardar 30 a 60 segundos. Esta temperatura deve ser medida com um termómetro, que deve ser recalibrado de 6 em 6 meses. A água do banho-maria deve estar em quantidade suficiente de modo a que a palhinha de sémen fique completamente submersa. Ao retirá-la, passado o tempo estipulado, deve-se limpar a água em excesso e os vestígios de nitrogénio que ainda possam persistir na mesma (Selk, 2002).

Um choque térmico nesta fase do procedimento é um risco que está bem avaliado e para o qual o manipulador deve ter o maior cuidado, uma vez que isto pode inviabilizar a amostra de sémen. Por isso, todos os procedimentos seguintes devem ser feitos com a maior rapidez, tentando manter a temperatura do sémen na palhinha entre os 15°C e os 37°C , valores compatíveis com taxas de prenhez satisfatórias (Hopkins & Evans, 2003). O pistoleio já deve estar previamente aquecido, esfregando-o vivamente com o auxílio de um papel ou colocando-o dentro da roupa, devendo ficar perto da temperatura corporal. Deve-se manipular a palhinha sempre que possível dentro da mão fechada, tentando manter a temperatura e utilizando uma toalha de papel para evitar contaminações.

De seguida, corta-se a ponta da palhinha com uma tesoura própria bem afiada, colocando-se depois no pistoleio, ajustando o êmbolo para retirar o espaço com ar e confirmar que o sémen aparece na ponta do pistoleio. Coloca-se ainda a bainha de plástico descartável que envolve o pistoleio de modo a que o material que contacta com as mucosas da vagina da vaca seja estéril. Volta-se a guardar dentro da roupa ainda antes de retirar a proteção plástica da bainha estéril, até se realizar a inseminação que deve acontecer num tempo máximo de 15 minutos (Selk, 2002).

Depois de confirmar o número do animal que se quer inseminar, deve-se utilizar a via reto-vaginal para realizar a inseminação. Coloca-se um braço no reto até identificar o cérvix

segurando-o, de maneira a esticar a vagina para uma mais fácil passagem do pistoleio. Deve-se limpar bem a vulva podendo-se utilizar os mesmos papeis que foram utilizados para limpar a palhinha na preparação (Wentink, 2004). O pistoleio deve ser inserido com uma inclinação de 30 a 40° de maneira a evitar a entrada uretral até ao corpo do útero onde deve ser depositado o sémen (O'Connor & Peters, 2003). Reconhece-se este local pela diferença de consistência dos tecidos depois da passagem de três ou quatro pregas do cérvix (Wentink, 2004; Selk, 2002). Este procedimento deve demorar entre 30 segundos a 2 minutos, sendo que um inseminador mais inexperiente, possa levar mais tempo. Geralmente, a deposição de sémen é feita demasiado rápida, podendo o sémen dirigir-se apenas para um corno uterino que apresente menos resistência. Por isso, esta deve ser uma ação realizada num período de 5 segundos. Se a deposição de sémen for para além do corpo uterino também pode resultar numa inseminação falhada, pois corre-se o risco de provocar lesões nas paredes do útero, mas também de o sémen ser depositado no corno uterino contrário ao ovário onde ocorreu a ovulação (Selk, 2002).

Deve-se ainda ter atenção ao historial do animal e da exploração, percebendo-se qual o maneio reprodutivo, se apenas são realizadas observações de cio ou se os diagnósticos de gestação são realizados com o auxílio de ecografia. Este meio de diagnóstico cada vez mais tem que ser valorizado uma vez que no caso de uma vaca já inseminada, se determina se ficou gestante ou não num tempo menor do que se utilizando apenas a palpação. No caso de explorações que não utilizem ainda este meio, deve-se ter o cuidado para inseminar no cérvix, em vez de ser no corpo uterino, uma vez que há algumas vacas que mostram sinais de cio mesmo na presença de um embrião. A introdução do pistoleio para além deste local poderia interferir com o embrião, ocorrendo a interrupção da gestação (Wentink, 2004).

Depois de retirado o pistoleio e de se ter terminado a inseminação, deve-se observar a palhinha e confirmar se o sémen foi mesmo libertado no interior da vaca. Deve-se ainda observar a bainha pois podem visualizar-se restos de sangue que indicam que a vaca já se encontrava em metaestro, podendo já ter passado o momento ideal de inseminação. Todos estes dados, devem ser registados em fichas próprias para o efeito, de modo a que se consiga fazer uma rastreabilidade e um melhor controlo reprodutivo (O'Connor & Peters, 2003).

PARTE II

Parte Experimental

1. Introdução ao estudo

Foi pela percepção de que cada vez mais os produtores se interessam pelo manejo reprodutivo das suas vacas, de modo que o intervalo entre partos seja o menor possível e a taxa de prenhez a mais alta, que se decidiu realizar este estudo, analisando retrospectivamente uma exploração de leite e realizando uma alteração a um protocolo reprodutivo, testando a sua eficácia.

Esta análise retrospectiva das explorações, seja de leite ou de carne, é importante para perceber onde há falhas de produtividade. Em bovinos, muitas destas falhas ocorrem na reprodução, objeto de estudo deste trabalho, propondo-se um protocolo reprodutivo modificado, a fim de perceber se a eficácia entre o protocolo *standard* e o modificado apresenta grande variabilidade nos resultados obtidos.

1.1. Objetivos

Assim, o primeiro objetivo foi caracterizar e avaliar os resultados reprodutivos numa exploração intensiva de leite comparando-os com os valores de referência. Depois desta análise aplicou-se na mesma exploração, um protocolo de inseminação a tempo fixo com CIDR, utilizando como variável o dia de administração da PGF_{2α} (24 horas antes da retirada do CIDR ou concomitante com esta), avaliando a eficácia do protocolo modificado através da fertilidade. Pretendeu-se com esta alteração diminuir uma manipulação dos animais, para que depois de verificada a sua eficácia, o protocolo possa ser aplicado principalmente em vacas de carne, onde este critério é mais valorizado.

Um outro objetivo que ao realizar o estudo se pretendeu concretizar foi relacionar a paridade (nº de lactações), intervalo parto-protocolo e manifestações de cios com a fertilidade final obtida.

Pretendeu-se ainda caracterizar a atividade ovárica no decorrer do protocolo dos animais estudados, através de ultrassonografia.

Definiram-se ainda variáveis que auxiliaram na concretização dos objetivos:

- Determinação do número de animais que fizeram demonstração comportamental e fisiológica de cio nos dois grupos em estudo;
- Determinação do número total de animais gestantes e comparação entre o grupo controlo e o grupo tratamento;
- Registo da atividade ovárica, determinando o número de folículos e de corpos de lúteo em diferentes dias do protocolo.

2. Material e Métodos

2.1. Seleção da Amostra

2.1.1. A Exploração

A exploração escolhida para a realização deste trabalho localiza-se em Caia – Elvas. Caracteriza-se por ser uma exploração de leite e foi escolhida não só pela disponibilidade demonstrada pelo produtor mas também pelas características específicas da mesma. A 1 de Janeiro de 2013, era composta por um efetivo de 1170 animais, sendo uma exploração fechada em regime intensivo. Ocupa uma área de 200 hectares sendo dividida por lotes de animais por nível de produção e por fase de desenvolvimento. É composta por um viteleiro, um parque de baixa produção e por 7 parques de alta produção. Estes últimos estão divididos por primíparas pós-parto, múltiparas pós-parto, outras primíparas, dois parques para outras múltiparas, vacas com macho e vacas com células somáticas altas.

Em todas as explorações, deve ser realizada periodicamente uma avaliação dos parâmetros reprodutivos, de modo a primeiramente conhecer os problemas existentes na própria exploração, para depois os poder resolver mais facilmente. Como tal, esta exploração em Caia utiliza o sistema informático Isaleite da Isagri que ao introduzir os dados recolhidos diariamente, torna mais claro a leitura e interpretação dos mesmos (Caldow *et al.*, 2005).

É importante ainda salientar que na exploração em causa, a deteção de cio é feita por observação direta e com o auxílio de podómetros ligados ao programa informático Afimilk da Afikim. Apesar de não ser um parâmetro direto para avaliação da fertilidade da exploração, o número médio de dias de lactação, que corresponde a 172 dias, também permite saber, de maneira prática e rápida, o estado reprodutivo da exploração estudada.

2.1.2. Escolha da amostra

Das vacas passíveis de serem inseminadas, ou seja, excluindo em primeira instância vacas gestantes e vacas em período de secagem, realizou-se a seleção da amostra. O programa informático já referenciado realizou também uma pré-seleção excluindo novilhas, vacas inseminadas há menos de 30 dias e que não tenham sido detetadas em cio, e vacas com menos de 45 dias pós-parto.

Apesar destas excluídas, ainda restava uma amostra demasiado grande para o estudo pretendido, pelo que se realizou uma consulta reprodutiva típica da exploração. O médico veterinário realizou, com o auxílio do ecógrafo Easi-ScanTM da BCF technology[©] e de uma

sonda linear de 7,5 Mhp, uma ultrasonografia retal ao grupo de animais selecionados (figura 8), avaliando o estado das gónadas, selecionando para a nossa amostra vacas cíclicas, com vários folículos de diferentes tamanhos e a maioria com um CL. Avaliou ainda todo o trato reprodutivo excluindo todas as que tivessem cicatrizes ou espessamentos a nível dos cornos uterinos, útero e cérvix. Excluiu-se ainda vacas que estivessem em cio, detetadas pelos sinais físicos ou comportamentais.

Através desta seleção morfológica, teve-se ainda atenção às características individuais de cada animal:

- idade do animal não superior a 5 anos;
- vacas apenas entre a 1ª e 4ª lactação;
- dias pós-parto não superior a 150 dias há exceção de um animal, que pelas suas características morfológicas decidiu-se incluir também;
- número de IA realizadas desde o último parto entre 0 a 2, à exceção de um animal.



Figura 8: Médico Veterinário a realizar avaliação reprodutiva de uma fêmea com auxílio de ecógrafo (fotografia original)

2.1.3. Escolha dos grupos em estudo

A divisão dos dois grupos em estudo foi realizada depois de analisadas todas as informações sobre os animais presentes na amostra, tentando-se criar os dois grupos o mais semelhante entre si (tabela 1).

Tabela 1: Características gerais (idade, nº de lactações, intervalo parto-protocolo, nº de inseminações) dos animais nos dois grupos da amostra selecionada para o estudo. Usou-se para seleção a data de nascimento, o número de lactações, a data do último parto e o número de IAs realizadas desde o último parto.

	Grupo Controlo	Grupo Tratamento
Nascidas em 2007	1	3
Nascidas em 2008	3	1
Nascidas em 2009	3	3
Nascidas em 2010	3	3
Vacas 1ª lactação	3	4
Vacas 2ª lactação	4	2
Vacas 3ª lactação	2	2
Vacas 4ª lactação	1	2
até 60 dias desde último parto	2	4
até 90 dias desde último parto	4	1
até 120 dias desde último parto	2	2
até 150 dias desde último parto	1	3
Com 254 dias desde último parto	1	-
0 IAs	5	5
1 IA	2	2
2 IAs	2	3
5 IAs	1	-

2.2. Protocolo Reprodutivo

O protocolo de inseminação utilizado neste estudo é uma variante ao protocolo *standard* de Inseminação Artificial a Tempo Fixo (IATF) utilizado em Portugal. No entanto, não é um protocolo original uma vez que já foi experimentado por vários autores, tais como, A. Gümen, Jörn Rudolph, M. A. Hittinger, entre outros (figura 9).

A alteração realizada foi decidida depois da observação da exploração com algumas dificuldades de reprodução, como já referido, tentando-se assim criar mais uma opção de tratamento. Denominou-se o primeiro dia do protocolo de dia 0, para uma mais fácil compreensão e observação do que foi realizado, seguindo-se essa contagem até ao término do estudo.

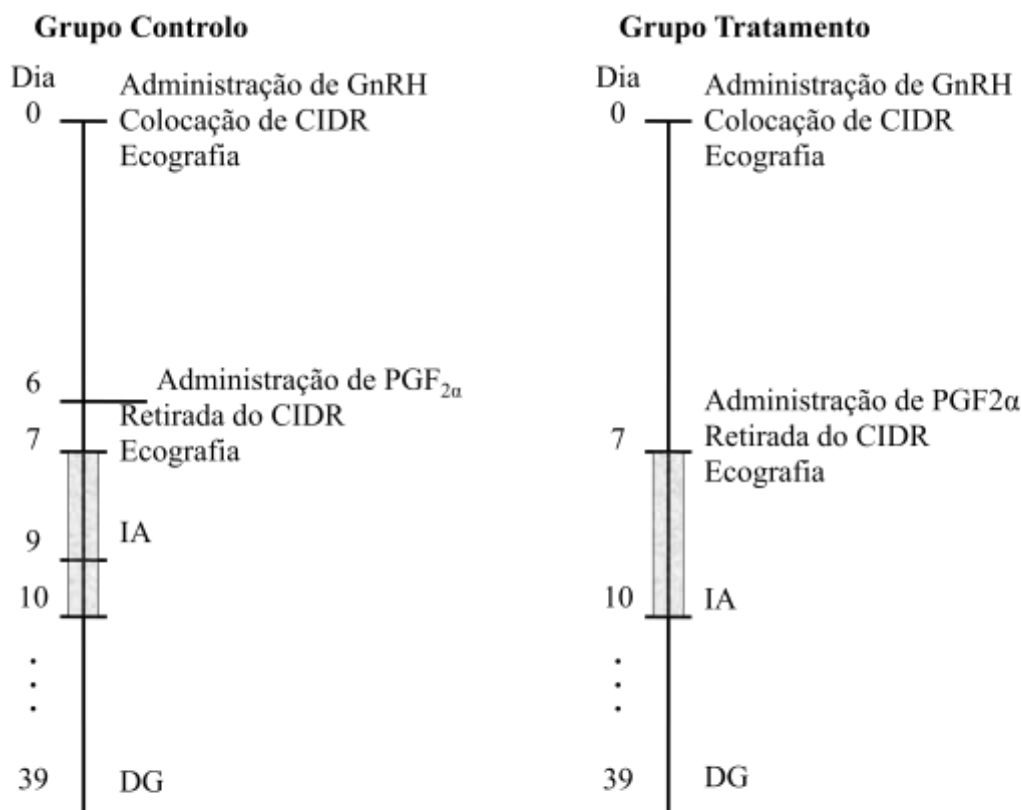


Figura 9: Protocolo utilizado no estudo, com 20 vacas distribuídas por 2 grupos: Grupo Controlo e Grupo Tratamento.

□ - período de tempo utilizado em observação de cio. GnRH - *Gonadotropin-releasing hormone*. CIDR - Dispositivo intravaginal libertador de prostaglandina. PGF_{2α} - Prostaglandina F_{2α}. IA - Inseminação artificial. DG - Diagnóstico de gestação

2.2.1. Fármacos

Para a realização deste estudo foi necessário o uso de medicamentos veterinários, pelo que foi solicitado o apoio de duas empresas farmacêuticas para o fornecimento de alguns destes materiais consumíveis. Assim, a Pfizer forneceu os CIDR e a hormona PGF_{2α}, limitando no entanto a nossa amostra, uma vez que apenas foram disponibilizados 20 dispositivos, que por sua vez eram essenciais ao estudo em questão. Utilizou-se ainda a hormona GnRH da MSD, disponibilizada pela própria exploração. Todos os medicamentos utilizados, são medicamentos veterinários autorizados em Portugal, utilizados habitualmente em explorações bovinas e estando comprovada e documentada a sua eficácia.

Para compreender melhor a sua ação no animal, é importante referir as suas características e que quantidade e método foi utilizado no presente estudo:

- o Easy-BreedTM CIDR[®], dispositivo intra-vaginal libertador de progesterona, é um produto Pfizer que contem na sua composição 1,38 g de progesterona por

dispositivo e tem um formato em T de modo a ficar fixo nas paredes da vagina, onde é inserido com o auxílio do aplicador próprio da marca;

- a hormona GnRH utilizada foi o Receptal[®] da MSD na quantidade de 2,5 ml por animal por via intra-muscular. Esta é uma solução aquosa de 0,004 mg/ml de buserelina e prevê-se que esta hormona provoque a ovulação dos folículos existentes maiores que 10 mm permitindo que ocorra uma nova curva de crescimento de um novo folículo;

- o Dinolytic[®] da Pfizer foi utilizado em cada animal numa quantidade de 5 ml por via intra-muscular. O princípio ativo desta solução é *Dinoprost trometamina* numa quantidade de 5 mg de *Dinoprost* por mililitro; este é o componente análogo da PGF_{2α} estando presente neste produto na forma cristalina do seu sal *trometamina* (THAM) (Apifarma/CESA, 2007).

2.3. Procedimentos

As vacas selecionadas para a amostra foram introduzidas no programa informático que está ligado à sala de ordenha em carrossel, de modo que, após a ordenha, estas vacas identificadas e separadas fossem para um parque de espera e daí para a manga onde foram palpadas.

No Dia 0 do protocolo, realizou-se o exame físico ao animal, incidindo particularmente no exame reprodutivo com o auxílio do ecógrafo, e colocaram-se os dispositivos libertadores de progesterona intrauterinos. Teve-se o cuidado de o fazer o mais assepticamente possível, procedendo-se à limpeza da vulva com papel, pulverizando-se o aplicador do CIDR com spray antibiótico e ainda usando luvas descartáveis, de acordo com as instruções do fornecedor. Administrou-se também a hormona GnRH, com uma agulha de 18 G (gaus) com 4 cm de comprimento e seringa descartáveis. Este material foi igualmente usado em todas as outras administrações parenterais realizadas durante o protocolo.

É importante salientar que todos estes procedimentos realizaram-se de igual forma e pelo mesmo manipulador em todas as vacas, não havendo variabilidade entre o grupo controlo e o grupo de estudo.



Figura 10: Colocação de CIDR com auxílio de aplicador (fotografia original)



Figura 11: Observação da correta apresentação do CIDR depois de colocado no animal (fotografia original)

No Dia 6 do protocolo, separaram-se os animais do grupo controle ($n = 10$) para administrar a $\text{PGF}_{2\alpha}$. No dia seguinte, Dia 7, aproximadamente 24 horas após a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$, retirou-se o Easy-Breed™ CIDR® das vacas do grupo controle e do grupo tratamento ($n = 20$). Contudo, neste último grupo, administrou-se no mesmo momento a $\text{PGF}_{2\alpha}$, com o mesmo método usado nas vacas do grupo controle, registrando-se a hora da administração para ter um melhor controle sobre a hora de ovulação e de inseminação.

Ainda no Dia 7, mas também no Dia 8 e 9, realizou-se a observação de cio ao longo de todo o dia mas mais especificamente, durante 30 minutos às 7:30 horas, às 13 horas e às 18 horas, registrando as ocorrências de monta ou qualquer outro sinal de cio registrando-se numa tabela (Tabela 4). No Dia 9 realizou-se também a inseminação artificial nas vacas do grupo controle, como indica o protocolo de inseminação a tempo fixo, 72 horas após a última administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$, que neste estudo aconteceu no Dia 6 de manhã.

Assim, as vacas deste grupo (controle, $n = 10$) foram inseminadas entre as 8 e as 10 horas do Dia 9 de protocolo com o sêmen do touro Big Winner, à exceção de uma das vacas que pelas suas características de cruzamento, deu-se preferência ao sêmen do touro Urbaniste para inseminá-la. Recorreu-se ao sêmen crio-conservado existente na exploração (figura 12), utilizando-se assim para o presente estudo, sêmen do mesmo lote, com a exceção já referida.

As vacas do grupo tratamento ($n = 10$) foram inseminadas com o mesmo sémen e o mesmo método que as anteriores, no Dia 10 de protocolo, entre as 9 horas e as 11:30.



Figura 12: Recipiente de armazenamento e conservação de sémen da exploração estudada (fotografia original)

Assim ficou completo o protocolo de inseminação a tempo fixo sendo apenas necessário voltar a manipular estes animais para o diagnóstico de gestação 29 dias após a última inseminação. Uma vez que é prática corrente da exploração, apesar de não estar contemplado no protocolo inicial, agendou-se a confirmação da gestação para todas as vacas positivas ou duvidosas à gestação para os 90 dias pós-inseminação. Os animais negativos à gestação, quer no diagnóstico de gestação no D39, quer na confirmação, retornaram aos protocolos habituais da exploração, terminando assim, a sua participação no estudo. (Rudolph *et al.*, 2011)

2.3.1. Método de IA

A técnica de inseminação deve ser realizada com o maior cuidado e respeitando as indicações de higiene necessárias. Como tal, iniciou-se por preparar uma dose de sémen retirando a palhinha identificada da botija de armazenamento com azoto líquido com o auxílio de uma pinça de metal. Colocou-se imediatamente em banho-maria a 37° C e aí permaneceu durante 10 segundos (figura 13). Secou-se com uma toalha de papel absorvente e cortou-se a ponta colocando-a logo de seguida no pistoleio (figura 14), previamente aquecido por fricção,

aplicando-se ainda a baina de plástico asséptica. Reservou-se dentro do fato-de-macaco do médico veterinário a fim de manter a temperatura. Já próximo do animal a inseminar, limpou-se bem a vulva da vaca com a mesma toalha de papel e inseriu-se o pistoleio com uma inclinação aproximada de 30 a 40° evitando assim a entrada uretral, passaram-se as 3 pregas do cérvix e depositou-se o sémen no colo uterino (figura 15). Removeu-se com cuidado e confirmou-se a injeção de todo o sémen; inutilizou-se a baina e a palhinha e limpando o pistoleio preparou-se uma nova dose, repetindo-se todo o procedimento.



Figura 13: Termo de aquecimento de palhinhas de sémen da exploração estudada (fotografia original)



Figura 14: Pistoleio utilizado na exploração estudada (fotografia original)



Figura 15: Inseminação artificial realizada pelo veterinário assistente da exploração (fotografia original)

2.4. Recolha e análise de dados

O limite do número da amostra devido à disponibilidade de material limitou o presente estudo, pois não foi recolhida uma amostra em número significativo para a realização de uma análise estatística. Contudo, a possibilidade de retirar dados retrospectivos da exploração e de toda a história dos animais presentes no estudo, tornou a análise possível em termos qualitativos.

Uma vez que ao longo do estudo, foi possível acompanhar todos os procedimentos, também foi possível retirar todos os dados pretendidos (Folha de campo em Apêndice I):

- Descrição detalhada dos animais (idade, paridade, data do último parto);
- Detecção de cio por observação direta (monta, vocalizações e descansar a cabeça noutra vaca ou *chin resting*) e utilização de podómetro.

Utilizou-se a ultrassonografia em vários momentos do estudo e para observar diferentes estruturas. No Dia 0 e no Dia 7 do protocolo, registou-se:

- a presença, número e tamanho (em milímetros (mm)) de folículos presentes em cada ovário;
- a presença, número e tamanho (em mm) de CLs em cada ovário;
- o estadio se possível dos CLs.

Nos dias 9 e 10 do protocolo, para as vacas do Grupo Controlo e Tratamento, respetivamente, realizou-se uma avaliação ecográfica das gónadas, registando-se os parâmetros já referidos, e uma avaliação de todo o trato uterino, avaliando a presença de sinais físicos de cio, registando-se também:

- a presença e cor do muco vaginal;

- a abertura ou não do cérvix;
- a tonicidade dos cornos uterinos com o critério de tónico e reativo, pouco tónico e reativo ou não tónico.

O Diagnóstico de Gestação (DG) também foi realizado com o auxílio do ecógrafo no Dia 39 do protocolo e registaram-se os resultados segundo os seguintes critérios:

- presença de bolsa amniótica e embrião - gestação positiva (+);
- presença de bolsa amniótica sem a presença evidente de embrião - gestação duvidosa para voltar a ver (incerto + ou incerto -);
- ausência de bolsa amniótica e de embrião - gestação negativa.

A confirmação da gestação foi realizada aos 90 dias pós-IA por palpação retal e apesar de não estar contemplada no desenho do estudo, é habitualmente realizada pela exploração em causa e como tal, vem confirmar os resultados obtidos no DG, sendo estes os resultados utilizados para a taxa de gestação.

Todas estas informações foram trabalhadas com o auxílio do programa *Microsoft Excel* ou colocadas diretamente em tabelas do programa *Microsoft Word*.

3. Resultados

3.1. Análise Retrospectiva da Exploração

De acordo com os objetivos propostos, analisou-se primeiramente a exploração escolhida, comparando os seus parâmetros reprodutivos com os valores da bibliografia, o que se traduz na tabela nº 2.

A taxa de inseminação indica o número de vacas inseminadas em 21 dias pelas vacas disponíveis no mesmo período de tempo, ou seja, um ciclo éstrico; a taxa de concepção (TC) consiste na fração do número de vacas gestantes pelo número de vacas inseminadas no mesmo período de tempo de 21 dias; e com o resultado destas duas taxas, através da sua multiplicação, calcula-se a taxa de prenhez, valor importante para a caracterização reprodutiva da exploração que no caso da nossa exploração é de 40% para as vacas multíparas. (UNAM, 2007)

Tabela 2: Análise dos parâmetros reprodutivos da exploração em estudo no ano de 2012 e comparação com os valores referência de Boersema *et al.* (2010)

Parâmetros	Exploração	Referência
Nº total de inseminações	2040	-
Nº multíparas totais	631	-
Taxa de inseminação das vacas multíparas	80 %	
TC das multíparas	49,4 %	> 95 %
TC à 1ª IA nas multíparas	12,1 %	> 60 %
TC à 2ª IA nas multíparas	14,3 %	
TC à 3ª IA ou mais nas multíparas	35,4 %	
Nº novilhas totais*	239	-
Taxa de inseminação das novilhas	78,7 %	
TC das novilhas	79,3%	
TC à 1ª IA nas novilhas	39,4 %	
TC à 2ª IA nas novilhas	32,4 %	
TC à 3ª IA ou mais	7,4 %	
Taxa de deteção de cio na exploração	54,9 %	
Idade média à 1ª IA	18 meses	15 meses
Intervalo parto – 1ª IA	65 dias	60 dias
Intervalo parto – concepção	163 dias	83 – 115 dias
Nº médio de dias em lactação	172 dias	160 – 170 dias
Taxa de refugo	22,9 %	< 10 %
Taxa de renovação	25,9 %	
* Número de novilhas totais em idade reprodutiva		

Note-se que a TC das vacas multíparas é muito inferior à do valor referência, enquanto que a TC das novilhas é substancialmente maior que o valor das multíparas na mesma

exploração. Este valor pode estar relacionado com a idade média à 1ª IA, que é maior na prática corrente da exploração quando comparada com a referência utilizada (Boersema *et al.*, 2010).

É importante ainda salientar que o intervalo parto – concepção é superior ao intervalo defendido pelo mesmo autor.

3.2. Resultados do Protocolo Reprodutivo em estudo

O principal objetivo de qualquer tratamento reprodutivo é ter as vacas gestantes, o que se determina com o Diagnóstico de Gestação (DG). No presente estudo, com o auxílio de ecografia, realizou-se um DG precoce ao 30º dia pós-inseminação (Gráfico 3) e realizou-se uma confirmação da gestação (DG final) passados 90 dias pós-inseminação (Gráfico 4).

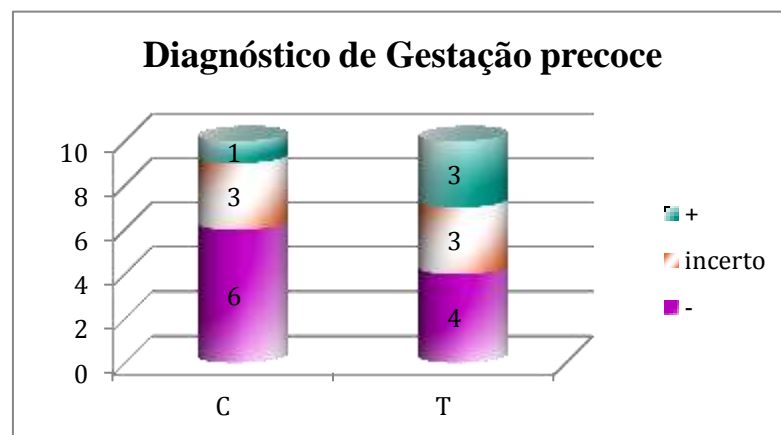


Gráfico 3: Resultados do diagnóstico de gestação precoce por ecografia nos grupos do estudo realizado ao Dia 39 do início do protocolo (C = Grupo Controlo; T = Grupo Tratamento).

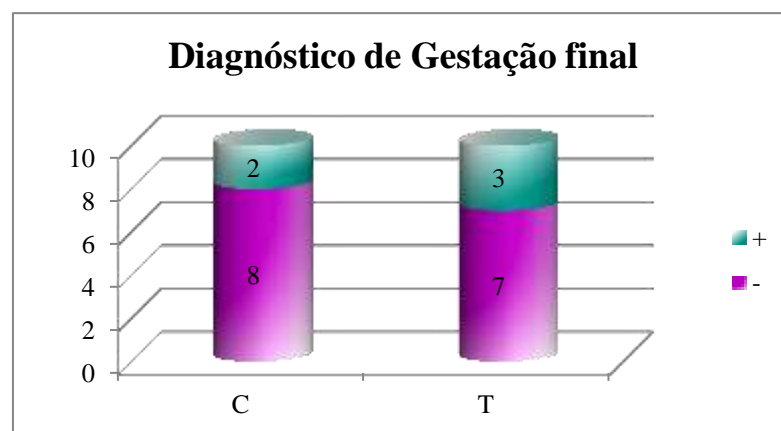


Gráfico 4: Resultados do diagnóstico de gestação final por ecografia nos grupos do estudo realizado aos 90 dias pós-inseminação (C = Grupo Controlo; T = Grupo Tratamento).

No DG precoce encontraram-se animais com gestação positiva, designando-se por “+” (figura 16 e 17), animais que não ficaram gestantes, designados por “-” ou “negativos” (figura 18) e animais com gestação incerta (+/-) que são assim denominados porque na observação ecográfica não se visualizou o embrião, tendo sido apenas observada a bolsa amniótica com líquido amniótico ou não (figura 19). Na confirmação da gestação, conseqüentemente do tempo decorrido, já é possível determinar, com maior certeza a gestação e por isso apenas se palpam os animais positivos e incertos.

Concluiu-se assim, que dos 3 animais caracterizados incertos do Grupo Controlo no DG precoce, 1 resultou como gestação positiva, obtendo-se um total de 2 animais positivos em 10; das vacas do Grupo Tratamento, nenhuma das incertas se tornou positiva, ficando num rácio final de 3 gestantes em 10 do total do grupo.



Figura 16: Diagnóstico de gestação positivo ao 29º dia após IA. 1: Embrião; 2: Líquido alantóide; 3: Líquido amniótico; “setas”: Âmnio (fotografia original)

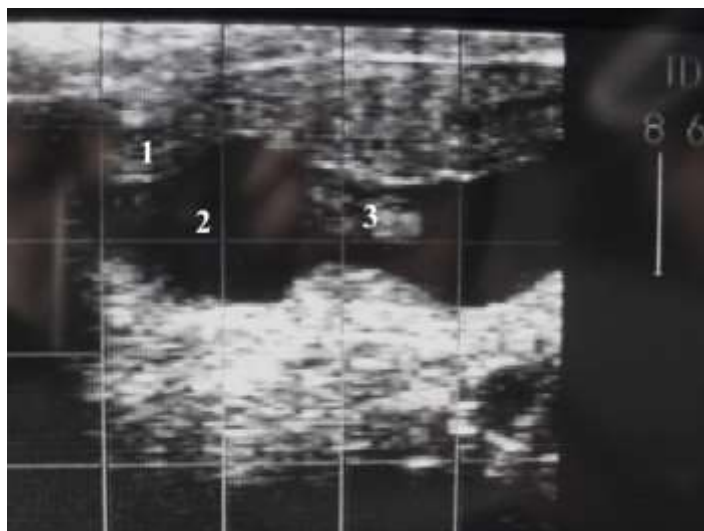


Figura 17: Diagnóstico de gestação positivo ao 29º dia após IA em corte longitudinal. 1: Endométrio; 2: Líquido alantóide; 3: Embrião (fotografia original)

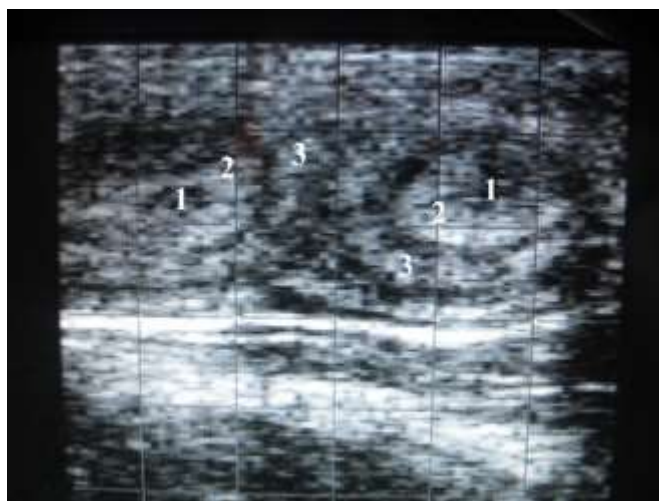


Figura 18: Observação dos dois cornos uterinos de uma vaca não gestante em corte transversal. 1: Lúmen do útero; 2: Endométrio; 3: Miométrio (fotografia original)



Figura 19: Ecografia realizada ao 29º dia após IA onde se constata morte embrionária pela ausência de embrião e pela descontinuidade da membrana amniótica. 1: Endométrio; 2: Líquido alantóide; “setas”: Âmnio descontinuado (fotografia original)

A tabela 3 explicita os dados gerais dos animais do estudo individualmente, bem como o seu resultado dos diagnósticos de gestação. Os dados do DG podem-se traduzir em taxa de concepção (TC) para uma maior facilidade quando comparamos os resultados do estudo com os da literatura existente.

Assumindo que a presença de bolsa amniótica indica que ocorreu concepção, a taxa de concepção precoce (assim denominada por correspondência aos resultados do DG precoce) é de 40% para o grupo controlo e 60% para o grupo tratamento. No entanto, a taxa de concepção final resulta num valor de 20% para o grupo controlo e de 30% para o grupo tratamento.

Tabela 3: Caracterização dos animais segundo os Grupos do estudo (C = Controlo e T = Tratamento), número de lactações, paridade, número de IA já realizadas desde o último parto, intervalo parto-protocolo, o resultado do diagnóstico de gestação precoce e final (os valores apresentados foram recolhidos no início do protocolo, mais precisamente no D0, à exceção dos diagnósticos de gestação).

Ident.	Lactação	Paridade	Nº IA	Intervalo parto-protocolo (dias)	DGp	DGf
C1	1	Primípara	2	143	-	-
C2	1	Primípara	1	78	+	+
C3	1	Primípara	0	72	+/-	-
C4	2	Múltipara	5	254	+/-	-
C5	2	Múltipara	1	90	-	-
C6	4	Múltipara	0	86	-	-
C7	2	Múltipara	0	110	-	-
C8	2	Múltipara	0	56	-	-
C9	3	Múltipara	2	99	-	-
C10	3	Múltipara	0	56	+/-	+
T1	4	Múltipara	0	54	-	-
T2	1	Primípara	2	142	+/-	-
T3	2	Múltipara	0	54	-	-
T4	3	Múltipara	0	57	-	-
T5	4	Múltipara	2	113	+/-	-
T6	1	Primípara	0	63	+	+
T7	1	Primípara	1	133	+	+
T8	2	Múltipara	1	101	+/-	-
T9	3	Múltipara	0	55	+	+
T10	1	Primípara	2	149	-	-

Legenda: DGp (+ se diagnóstico de gestação positivo ao dia 30 após a IA nas vacas controlo e ao dia 29 nas vacas tratamento, +/- se resultado incerto e - se diagnóstico de gestação negativo nestas mesmas datas). DGf indica o diagnóstico de gestação final, ou seja, aos 90 dias pós-inseminação.

Quando se relaciona o número total de animais gestantes na amostra (5 em 20) com o número de lactações das vacas obtém-se uma proporção de 3 primíparas gestantes em 7 totais (42,9%) para uma proporção de 2 múltiparas em 13 totais (15,4%). A diferença entre os dois grupos do estudo não aparenta ser significativa revelando esta mesma tendência.

Utilizando o valor descrito por Boersema *et al.* (2010), que refere que o intervalo parto-concepção deve ser menor que 115 dias, pudemos perceber que 4 das 5 vacas que ficaram gestantes no total da amostra estão dentro deste valor. Na amostra tínhamos 15 animais que partilhavam desta mesma condição na data de início do protocolo.

A realização de um protocolo com IATF tem como vantagem a ausência de observação do comportamento de cio e é fundamental para explorações em que este procedimento é o maior entrave ao sucesso reprodutivo. Ainda assim, e como o protocolo realizado é um estudo, decidiu-se observar quer os sinais físicos (figura 20) quer o comportamento de cio (figura 21) que reportam esse estado (tabela 4). Assim, atendendo que o comportamento de cio pode ser caracterizado pela observação direta e pelo podómetro, 40% dos animais do Grupo Controlo manifestaram cio e destes apenas 1 ficou gestante; e no Grupo Tratamento observou-se 30% dos animais em cio e 2 ficaram gestantes. Um animal em cada um dos grupos ficou gestante, mesmo não se tendo observado comportamento de cio.



Figura 20: Observação de muco translúcido no dia de inseminação das vacas do estudo (fotografia original)



Figura 21: *Chin resting*, uma das manifestações de comportamento de cio observadas na exploração durante o estudo (fotografia original)

Tabela 4: Resultados obtidos na observação de cio e ao exame físico dos animais no dia da IA (D9 e D10 para as vacas do grupo controlo e do grupo tratamento, respetivamente)

Identificação	Observação Direta	Podómetro	Tonicidade do útero	Muco	Cérvix	DGp	DGf
C1	Sim	x	2	Sim	0	-	-
C2	Sim	x	2	x	3	+	+
C3	Não	x	3	Sim	3	+/-	-
C4	Não	Sim	0	Sim	0	+/-	-
C5	Não	Não	3	Sim	0	-	-
C6	Não*	x	3	Não	3	-	-
C7	Não	x	3	Sim	0	-	-
C8	Sim	x	3	Sim	0	-	-
C9	Não	x	1	x	3	-	-
C10	Não	x	1	x	0	+/-	+
T1	Sim	Sim	3	Não	0	-	-
T2	Não	x	3	x	3	+/-	-
T3	Não	Não	2	Não	2	-	-
T4	Não	x	3	Sim	3	-	-
T5	Não	x	3	Sim	3	+/-	-
T6	Não	x	3	x	2	+	+
T7	Não	Sim	3	Sim	3	+	+
T8	Não	Não	0	Não	3	+/-	-
T9	Sim	Sim	3	Sim	3	+	+
T10	Não	x	3	Sim	2	-	-

Legenda: Na coluna Observação Directa: se “Sim”, manifestação comportamental observada de cio; se “Não”, não observada qualquer manifestação de cio. *- quebra de produção leiteira. Na coluna podómetro: se “Sim”, pico de atividade registada por este método; se “Não”, sem pico de atividade; se “x”, animal sem podómetro. Na coluna Tonicidade do útero: se “3”, útero tónico e reativo; se “2”, útero pouco tónico; se “1”, útero não tónico; se “0”, útero não observado. Na coluna Muco: se “Sim”, presença à manipulação de corrimento translúcido vaginal (figura 20); se “Não”, ausência de muco; se “x”, não observado. Na coluna cérvix: se “3”, aberto; se “2”, ligeiramente aberto ou em apenas algumas pregas; se “1”, fechado; se “0”, não observado.

3.3. Resultados Ecográficos das Gónadas ao longo do estudo

Com o intuito de caracterizar a atividade ovárica durante as alterações hormonais provocadas pelos medicamentos utilizados no protocolo, realizou-se em três momentos diferentes, ecografias por via retal a cada um dos animais, resultados esses apresentados na tabela 5 e 6.

Tabela 5: Descrição morfológica das gónadas dos animais em estudo, realizadas por ecografia transretal aos dias 0, 7 e 9 de protocolo para o grupo controlo, para comparação com os resultados obtidos (DGf).

Ident.	Ovário	D0	D7	D9	DGp	DGf
C1	dto.	2 folículos com 1 cm 1 folículo < 1 cm	1 folículo com 1,5 cm 2 folículos < 1 cm	1 folículo com 1,7 cm	-	-
	esq.	CL cavitário	CL cavitário com 3 cm	CL com 1 cm		
C2	dto.	1 folículo com 1 cm	CL com 1 cm 1 folículo < 1 cm	Ov. muito pequeno	+	+
	esq.	CL cavitário ou folículo	1 folículo com 2 cm CL com 1,5 cm	1 folículo com 2 cm		
C3	dto.	CL cavitário	CL cavitário com 2,5 cm 1 folículo < 1 cm	-	+/-	-
	esq.	1 folículo com 2 cm	CL com 2 cm	-		
C4	dto.	1 folículo com 2 cm	Ov. muito pequeno CL com 1,7 cm	Ov. muito pequeno (< 2 cm) 1 folículo pré-ovulatório com	+/-	-
	esq.	CL	1 folículo com 1,5 cm 2 cm			
C5	dto.	CL	1 folículo com 2 cm CL com 1,8 cm	1 folículo com 1,5 cm	-	-
	esq.	1 folículo com 2 cm folículos < 1 cm	1 folículo com 2,2 cm 2 folículos < 1 cm	CL com 1,5 cm		
C6	dto.	1 folículo com 3 cm 1 folículo com 1,5 cm	-	CL 1,2 cm	-	-
	esq.	1 folículo com 3 cm ou CL	-	CL hemorrágico 1 folículo com 1 cm		
C7	dto.	Ov. pequeno com folículo de 0,5 cm	1 folículo com 2 cm	-	-	-
	esq.	CL 1 folículo com 2 cm	1 folículo com 1,5 cm CL com 1,8 cm	-		
C8	dto.	CL 1 folículo com 1 cm	CL com 1,5 cm 1 folículo com 2 cm	1 folículo com 2 cm	-	-
	esq.	1 folículo com 1,5 cm 1 folículo com 1 cm	1 folículo com 1,8 cm	-		
C9	dto.	1 folículo com 2 cm	CL cavitário com 2 cm 1 folículo < 1 cm	não tem estruturas	-	-
	esq.	folículos < 1 cm	1 folículo com 1 cm 1 folículo < 1 cm	1 folículo com 1,5 cm		
C10	dto.	CL cavitário 1 folículo com 1,5 cm	CL cavitário com 0,5 cm 1 folículo com 1,2 cm	CL com 1 cm	+/-	+
	esq.	-	Ov. muito pequeno	-		

Tabela 6: Descrição morfológica das gónadas dos animais em estudo, realizadas por ecografia transretal aos dias 0, 7 e 10 de protocolo para o grupo tratamento.

Ident.	Ovário	D0	D7	D10	DGp	DGf
T1	dto.	CL cavitário 1 folículo com 2 cm	Ov. muito pequeno 1 folículo < 1 cm	CL com 1 cm 1 folículo < 1 cm	-	-
	esq.	1 folículo com 2,5 cm 1 folículo com 1 cm	1 folículo com 1,8 cm CL com 1,5 cm	1 folículo com 1,5 cm		
T2	dto.	1 folículo com 3 cm	1 folículo com 3,5 cm 1 folículo com 1 cm	1 folículo com 1,5 cm	+/-	-
	esq.	1 folículo com 3 cm	CL com 1,5 cm	1 folículo com 2,5 cm		
T3	dto.	CL 1 folículo com 1 cm	CL com 1 cm 2 folículos com 1 cm	1 folículo com 1 cm CL com 1 cm (Figura 22)	-	-
	esq.	1 folículo com 3 cm	CL cavitário com 3 cm 1 folículo com 1 cm	Ov. parado		
T4	dto.	CL 1 folículo com 1,5 cm	1 folículo pré-ovulatório com 2,2 cm CL com 1,8 cm 2 folículos < 1 cm	1 folículo com 1,2 cm 1 folículo com 1 cm	-	-
	esq.	1 folículo com 1 cm	1 folículo com 2 cm 1 folículo < 1 cm	Ov. pequeno		
T5	dto.	CL 1 folículo com 1,5 cm	CL com 2,5 cm 1 folículo com 2 cm 1 folículo < 1 cm	1 folículo com 1,5 cm CL < 1 cm	+/-	-
	esq.	Ov. parado	-	Ov. pequeno		
T6	dto.	1 folículo com 1,5 cm 1 folículo com 1 cm	1 folículo com 1,5 cm 1 folículo < 1 cm CL avançado com 1,6 cm	CL com 1 cm	+	+
	esq.	CL estacionário	Ov. parado	1 folículo com 1,5 cm		
T7	dto.	1 folículo com 2 cm 1 folículo com 1 cm	Ov. muito pequeno 2 folículos < 1 cm	1 folículo < 1 cm	+	+
	esq.	CL	CL com 2,5 cm	Ov. pequeno CL < 1 cm		
T8	dto.	CL cavitário 1 folículo com 1 cm	CL cavitário com 2,5 cm 1 folículo com 1 cm	Depressão ovulatória	+/-	-
	esq.	-	CL com 1,5 cm	CL com 1,3 cm		
T9	dto.	CL 1 folículo com 3 cm 1 folículo com 2,5 cm	1 folículo com 3 cm 1 folículo com 1,5 cm folículos < 1 cm	1 folículo pré-ovulatório com 2,3 cm 1 folículo com 1,2 cm CL com 1,5 cm	+	+
	esq.	2 folículos com 0,5 cm	CL com 1,2 cm	Ov. Parado		
T10	dto.	CL 1 folículo com 2 cm 1 folículo com 1 cm	CL com 2 cm 1 folículo < 1 cm	1 folículo com 1,5 cm	-	-
	esq.	2 folículos com 1 cm	1 folículo com 1,5 cm	CL com 1,2 cm		

No início do protocolo, era condição da escolha da amostra que todas os animais estivessem cíclicos. Assim, visualizou-se por ecografia, que todas as vacas tinham pelo menos um folículo com 1 cm de diâmetro (Figura 23) e 17 dos 20 animais da amostra apresentavam 1 CL num dos ovários (Figura 24). Não se verificou uma diferença significativa no diâmetro dos folículos entre o ovário esquerdo e direito (Gráfico 5, a).

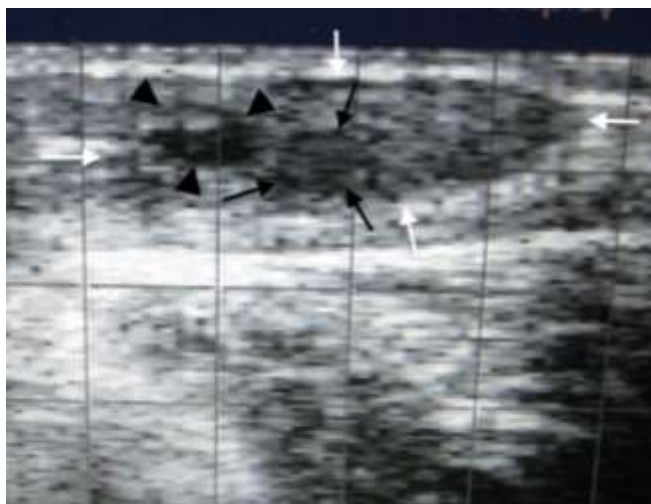


Figura 22: Ovário (setas brancas) de vaca observado por ecografia transretal, observando-se um CL (setas pretas) com aprox. 1 cm e folículo (cabeça de seta preta) com aprox. 1 cm (fotografia original)



Figura 23: Ovário (setas brancas) observado por ecografia transretal, observando-se um folículo (cabeça de seta preta) com aprox. 2 cm (fotografia original)

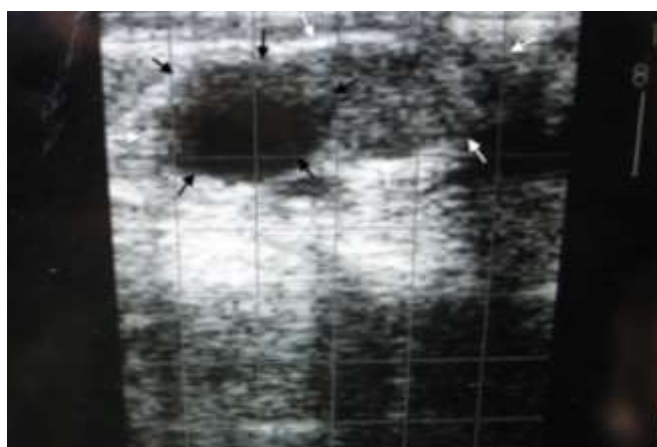


Figura 24: Ovário (setas brancas) de vaca observado por ecografia transretal, observando-se um CL cavitário (setas pretas) de grande tamanho (aprox. 2 cm) (fotografia original)

Ao 7º Dia de protocolo, dia da retirada do CIDR e dia da administração da PGF_{2α} no caso dos animais do Grupo Tratamento, tal como esperado, todos os animais da amostra apresentavam um CL. 17 das 20 vacas totais apresentavam um folículo com um diâmetro superior ou igual a 1 cm, indicando que estariam perto da ovulação (Gráfico 5, b).

No dia da IA, dia 9 para o grupo controlo e D10 para o grupo tratamento, é importante salientar que observaram-se apenas 2 animais dos 20 ecografados com foliculos pequenos. Observou-se também um menor número de CL presentes nas vacas do Grupo controlo (4 em 10) enquanto que nos animais do Grupo tratamento ainda se observaram CL em 8 das 10 vacas do grupo, embora estes fossem de pequenas dimensões (Gráfico 5, c).

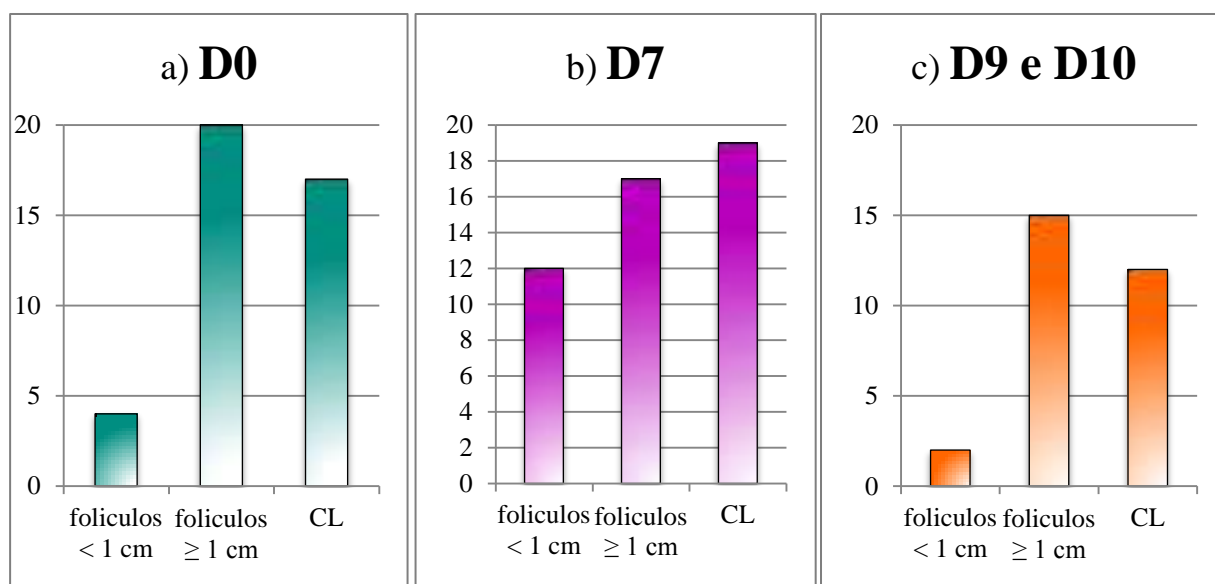


Gráfico 5: Presença de estruturas significativas em cada animal no momento de início do protocolo (a), ao dia 7 (b) e ao dia 9 para vacas do grupo controlo e dia 10 para as vacas do grupo tratamento (c).

4. Discussão

Os presentes resultados revelaram que o protocolo em estudo pode ser utilizado como protocolo reprodutivo. Contudo, a amostra utilizada nos dois grupos em estudo (n=10 para cada grupo) não permitiu efetuar generalizações, pois não era representativa da população, por se tratar de uma amostra de conveniência e de pequena dimensão.

4.1. Seleção da amostra

A amostra foi selecionada das vacas disponíveis na exploração escolhida. Excluiu-se primeiramente as novilhas que pela sua condição física têm taxas de inseminação e concepção diferentes das vacas primíparas e múltiparas (Sartori, 2006). O mesmo acontece com vacas primíparas em comparação com as vacas múltiparas, que apresentam taxas de concepção menores que as primeiras (Tenhagen *et al.*, 2004). Este pressuposto ainda é controverso na comunidade científica mas verificou-se esta mesma tendência no presente estudo.

Na exploração selecionada, é realizada uma avaliação ao aparelho reprodutivo das vacas paridas há pelo menos 45 dias, avaliando o retorno morfológico destas estruturas. Nessa avaliação, decide-se se é necessário administrar algum medicamento, nomeadamente antibiótico no caso de metrite, ou se o animal já está preparado para iniciar um protocolo reprodutivo, ou se está a ciclar, devendo-se aguardar uma manifestação de cio. Posto isto, apenas vacas paridas há mais de 45 dias pertenciam à lista de seleção para a amostra, sendo que só seriam inseminadas com mais de 55 dias. Este intervalo é designado por período voluntário de espera (PVE), determinando o tempo mínimo que o útero desta espécie animal leva para se restabelecer da gestação anterior e para voltar a poder ser inseminada. O tempo que o útero leva para se restabelecer após uma gestação está compreendido entre os 30 e os 50 dias pós-parto (Ptaszynska, 2007; UNAM, 2007). O PVE praticado na exploração é o correto uma vez que, apesar de ainda ser discutível (Ball & Peters, 2004), diversos autores designam como PVE ideal os 50 dias (Whisnant *et al.*, 2000; Lamb *et al.*, 2001; Lee & Kim, 2007) e outros os 60 dias (Nebel, 2003; Walsh *et al.*, 2008).

Excluíram-se vacas com cicatrizes e aderências no trato uterino uma vez que estas malformações, derivadas de problemas em gestações anteriores, podem comprometer a função de movimentação do óvulo pelos cornos uterinos ou de implantação no útero (UNAM, 2007; Grajales & Valencia, 2008). Apesar disso, estas fêmeas podem igualmente ser fecundadas, mas requerem uma maior atenção na sua avaliação retrospectiva, uma vez que muitas destas tornam-se *repeat breeders*, ou seja, demoram muito tempo para ficarem gestantes, deixando de ser rentáveis para a exploração. Foram ainda excluídas vacas em cio

uma vez que no momento da seleção da nossa amostra, realizou-se em paralelo a avaliação reprodutiva mensal da exploração, sendo estes animais IA no mesmo momento, sem que isto tivesse interferido no presente estudo.

Na escolha dos animais tentou-se também que estes tivessem características fisiológicas semelhantes (idade, número de lactações, dias pós-parto, número de inseminações realizadas desde o último parto), de modo que as suas diferenças não fossem significantes para os resultados obtidos, podendo-se formar os dois grupos de estudo também o mais equilibrados possível.

4.1.1. A exploração

Para a realização do estudo proposto, a exploração escolhida tinha de observar alguns critérios específicos: o número de vacas disponíveis para a realização do protocolo; disponibilidade e acessibilidade por parte do produtor para que não houvesse entraves na aplicação do mesmo, nem na realização das inúmeras visitas à exploração para recolha de dados; a presença de um registo completo de dados reprodutivos que pudessem ser consultados e disponibilizados para este trabalho.

A exploração escolhida contemplava estas características e, para além disso, ainda disponibilizou algum material necessário, bem como a presença constante de um veterinário para assegurar que todo o trabalho técnico fosse bem realizado e que também não houvesse mais uma variável.

Dos dados retrospectivos recolhidos na exploração, percebeu-se que a exploração teria alguns problemas de reprodução uma vez que a taxa de conceção das vacas múltiparas (49,4%) era inferior ao valor de referência ($> 95\%$; Boersema *et al.*, 2010). Este valor indica que as vacas estão a ser muitas vezes inseminadas até ficarem gestantes. Isto pode dever-se a diversos fatores, tais como o momento da IA não estar a ser o mais correto, a falha dos inseminadores, falha na determinação de cio ou nos próprios procedimentos da inseminação - método ou o sémen não ser de boa qualidade. Quando se utilizam protocolos reprodutivos, o fato de os animais não ficarem gestantes pode significar que estes não estão a ser corretamente aplicados ou que não estão a ser realizados no momento adequado, pelo que as vacas não respondem aos tratamentos como era esperado.

O baixo valor da TC deve-se também aos resultados da TC à primeira IA que segundo Boersema *et al.* (2010) deve ser superior a 60% e que na exploração é de apenas 12,1% para as múltiparas. Para se conseguir uma exploração saudável em termos reprodutivos, este valor deveria ser muito superior, revelando-se aqui o maior problema reprodutivo da presente

exploração, devendo-se incidir outros estudos para tentar determinar a ou as razões que levam a estes resultados.

Apesar disso, a TC das novilhas é superior à das múltíparas, talvez porque na exploração é mais utilizada a inseminação a cio observado nas novilhas enquanto que nas múltíparas são mais utilizados protocolos reprodutivos. Este pressuposto vai de encontro ao que Rudolph *et al.* (2011) apresentou, chegando à conclusão que a TC é maior quando a IA é realizada a cio observado quando comparada com a IATF. Isto pode ser indicativo de que na exploração em estudo, a detecção de cio é uma melhor prática, quando comparada com a aplicação de protocolos de IATF, embora fosse necessário estudar específica e futuramente também esta questão.

Por outro lado, este critério da TC ser superior nas novilhas comparativamente com as múltíparas também está relacionado com a idade com que as novilhas começam a ser inseminadas (18 meses). Este valor é superior ao valor referência (15 meses) estando estes animais mais desenvolvidos quer a nível morfológico quer a nível hormonal, observando-se sinais de cio mais visíveis quando comparados com os da bibliografia, e estando também mais responsivas quando se utiliza protocolos reprodutivos (Boersema *et al.*, 2010). A desvantagem deste início tardio prende-se com o fato de existir vacas que desenvolvem maturidade sexual precocemente e que já poderiam ter ficado gestantes ainda antes dos 18 meses de idade, perdendo-se tempo desnecessariamente.

O resultado obtido na exploração para o intervalo parto-concepção (163 dias) também é superior ao do valor de referência (83 a 115 dias; Boersema *et al.*, 2010). Este aumento pode ser devido a doenças reprodutivas no pós-parto que fazem atrasar a involução uterina e, conseqüentemente, o retorno à atividade cíclica normal; por dificuldades na observação do cio e percepção que os animais já estão a ciclar; ou por dificuldades na IA e em todo o processo que leva a vaca a ficar gestante. Do mesmo modo que atrasar o início do período reprodutivo nas novilhas vai atrasar o número de vezes que cada animal fica gestante na sua vida útil, também o aumento deste intervalo vai atrasar este mesmo número, acabando em última instância por existir mais gastos no sustento destes animais que não estão a produzir como deveriam.

Uma das objeções encontradas para a realização do estudo nesta exploração é o fato de se tratar de uma exploração leiteira, quando o protocolo é proposto para vacas de carne. Por uma maior facilidade e disponibilidade da própria exploração, o estudo foi realizado nesta exploração de vacas de leite, tentando-se extrapolar depois os resultados para vacas de carne com auxílio da literatura existente.

A importância de um protocolo que tenha um menor número de ações nos animais prende-se com o fato das características comportamentais e genéticas das raças das vacas de carne serem menos dóceis, logo mais difíceis de manipulação. A esta característica acrescentam-se os poucos meios de contenção nas explorações de carne que dificultam o trabalho dos manipuladores (tratadores e veterinários), e que conseqüentemente demoram mais tempo nos tratamentos realizados, pelo que terão mais custos ao produtor em mão-de-obra (Lamb *et al.*, 2006). Com a dificuldade de manipulação dos animais, em parte por estarem menos habituados à presença humana, há sempre um risco acrescido de lesões traumáticas que estes possam sofrer mas também o risco de diminuição do ganho médio diário de carne (Ball & Peters, 2004; Cooke *et al.*, 2009) e da fertilidade (Ball & Peters, 2004; Ptaszynska, 2007) devido ao stress a que estão sujeitos durante todo o processo. Este é um fator importante pois afeta a reprodução desde o parto até à gestação seguinte estar bem estabelecida, quer por ocorrer a possibilidade de redução da intensidade do estro e da produção de progesterona ou mesmo por poder levar à perda embrionária ou fetal.

4.2. Análise da seleção do Protocolo Reprodutivo

A escolha do protocolo surgiu durante o estágio curricular de clínica e cirurgia de espécies pecuárias, sendo mais direcionado para a área de bovinos, quer de leite quer de carne. Depois de observada a prática nas explorações leiteiras onde se realiza com grande frequência as consultas reprodutivas e a aplicação de protocolos hormonais reprodutivos, e com a constatação de que cada vez mais, também os produtores de carne querem aderir a estas manipulações, pensou-se realizar um estudo em que estes protocolos tivessem uma aplicação mais prática neste último grupo de vacas.

O protocolo foi selecionado depois da campanha de apresentação do novo PRID[®] Delta da CEVA, onde o Dr. Alex Souza apresentou um estudo por si realizado (figura 25), utilizando os novos PRID[®] Delta com um esquema de protocolo semelhante ao utilizado neste estudo.

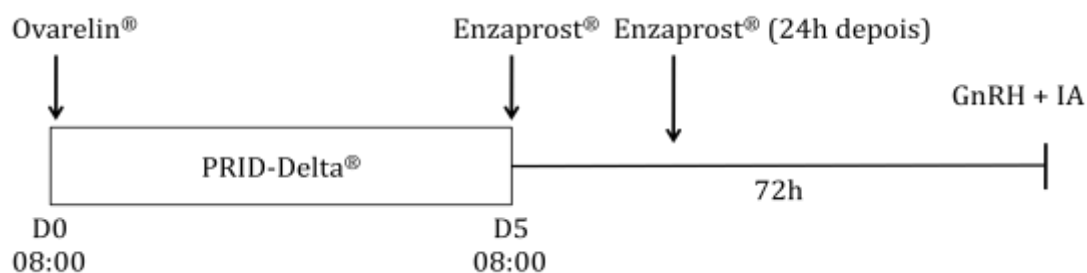


Figura 25: Protocolo Syncroplus de 5 dias e com utilização de progesterona realizado pelo Dr. Alex Souza e patrocinado pela CEVA. D0 e D5: Dia 0 e Dia 5; GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormone; IA: Inseminação Artificial; h: horas.

Tentou-se junto desta companhia farmacêutica que patrocinassem os novos PRID[®] Delta, a fim de comprovar a sua eficácia e também a de testar o protocolo. Contudo, estes não foram disponibilizados a tempo do início do protocolo pelo que se optou por utilizar os dispositivos já disponíveis no mercado, o CIDR[®] da Pfizer, atual Zoetis, que foram cedidos por esta. Apesar de não ter sido concretizado um dos primeiros objetivos que seria testar a aplicação dos novos PRID[®] Delta, este impedimento acabou por ser positivo uma vez que existem muitos mais estudos com o CIDR[®], com os quais podemos comparar o presente estudo. A Pfizer também forneceu a hormona PGF_{2α} na fórmula do Dinolytic[®] e a exploração ficou com o encargo de fornecer o análogo da hormona GnRH, sendo utilizado o Receptal[®] da MSD, e por este motivo ficou limitado o número da amostra e o tipo de protocolo utilizado, optando-se por utilizar apenas uma vez a GnRH (figura 9). Com esta opção tomada, já era esperado que o tempo de ovulação não estaria tão sincronizado como quando se utiliza GnRH também no momento da IA ou 12 a 16 horas antes da IA (Hittinger *et al.*, 2004; Lamb *et al.*, 2001; Madureira *et al.*, 2004), esperando-se portanto uma TC mais baixa. Contudo, isto não foi um impedimento à realização do estudo pois do ponto de vista prático, qualquer exploração também se preocupa com os custos dispendidos para medicamentos e tratamentos, sendo este também um objetivo das mesmas – a redução dos custos.

4.3. Análise de dados / Análise dos resultados obtidos

Os resultados obtidos permitem pressupor que um protocolo com administração de PGF_{2α} no momento da retirada do CIDR pode ser igualmente utilizado sem que haja uma quebra na taxa de concepção. Estes resultados são corroborados por diversos autores (Hittinger *et al.*, 2004; Perry & Perry, 2009; Rudolph *et al.*, 2011) tendo estes, no entanto, melhores resultados que o presente estudo. No artigo publicado por Ambrose *et al.* (2008) são mostrados resultados com TC mais elevadas, uma vez que o estudo consistiu em comparar um

protocolo com o uso de progesterona durante 8 dias (TC = 61,8%) e um protocolo com PGF_{2α} no dia da retirada do CIDR, no dia 7 de protocolo (TC = 55,6%) e no dia 8 de protocolo (TC = 54,1%). Contudo, estes valores podem ter sido influenciados pelas IA que foram realizadas a cio observado embora se tratasse de um protocolo a tempo fixo. No presente estudo também foram detetados animais com comportamento de cio (7 em 20 animais totais da amostra; tabela 4) que por restrição ao protocolo estabelecido não foram inseminados nesse momento, podendo ser essa uma das justificações para os fracos resultados obtidos.

Uma outra justificação possível para os resultados no presente estudo serem inferiores aos da literatura disponível, pode dever-se ao fato de ter sido suprimida uma administração de GnRH, embora esta opinião ainda seja discutível. No estudo de Rudolph *et al.* (2011), foi realizado um protocolo semelhante, sendo que a única diferença foi a realização da IA a cio observado tendo por isso sido obtido uma TC maior (50,4%). As vantagens da redução de uma administração de qualquer medicamento é, em primeira instância a redução de custos quer logísticos quer do próprio fármaco. A desvantagem, neste caso em particular de ausência de uma segunda administração de GnRH no momento de retirada do CIDR ou no dia da IA, pode significar um atraso na ovulação em vacas que estejam na fase de metaestro do ciclo éstrico, havendo uma maior variabilidade na hora de ovulação e consequentemente na hora em que deveria ocorrer a IA (Hittinger *et al.*, 2004). É por este motivo que resulta em boas taxas de concepção em protocolos com IA a cio observado. Não sabendo o estado cíclico de cada um dos animais, acaba por ser contraproducente estar a aplicar um protocolo de IATF que poderá ter uma alta probabilidade de falhar. Perry & Perry (2009) confirma esta suposição, explicando que o tratamento com GnRH no momento da IA só influencia a TC se o pico de LH espontâneo ainda não tiver ocorrido, ou seja, normalmente 12 h após a observação do cio.

4.3.1. Resultados obtidos vs. Morte Embrionária

O Diagnóstico de Gestação (DG) precoce, realizado ao 29º dia após a IA para as vacas do grupo tratamento e ao 30º dia para as vacas do grupo controlo, revelou que 6 dos 20 animais dos dois grupos do estudo obtiveram um resultado positivo de gestação (C3, C4, C10, T2, T5 e T8) embora apenas uma destas vacas (C10) tenha ficado gestante. Esta diferença pode ter resultado de uma morte embrionária precoce uma vez que o período dos 30 aos 55 dias de gestação é aquele em que se verifica uma maior incidência de perdas embrionárias. Por outro lado, está descrito que o protocolo Pré-sincronização/Ovsynch/CIDR tem uma

menor taxa de perdas embrionárias (7%) do que o protocolo Pré-sincronização/Ovsynch (Thatcher *et al.*, 2006), justificando uma vez mais o protocolo utilizado no presente estudo.

Uma das vantagens da realização do DG precoce é a possibilidade de perceber se ocorreu uma falha do protocolo, não chegando a ocorrer a fecundação, ou se realmente esta aconteceu, mas que por qualquer outro motivo, seja fisiológico ou externo, o embrião não tenha sobrevivido. Se ocorrer um aborto entre os dias 24 a 42 após a IA é considerado morte embrionária tardia, ocorrendo conseqüentemente reabsorção embrionária intra-uterina. Com a realização do DG o mais cedo possível com o auxílio da ultrassonografia, após o 28º dia, o veterinário consegue perceber o que aconteceu internamente na fêmea, observando-se neste caso apenas o saco amniótico ou um embrião muito pequeno que por vezes já nem está viável, comprovando-se na 2ª ecografia, ou seja, na confirmação da gestação, que a vaca em questão já não está gestante, podendo ser este o caso das 5 vacas deste estudo (tabela 3; figura 19). Assim, a ultrassonografia é uma mais valia para a avaliação destes casos de falha da gestação, podendo diferenciar alguns casos de morte embrionária dos casos de falha da fecundação. (UNAM, 2007)

4.3.2. Resultados obtidos vs. Lactação

O número de lactações que uma vaca já teve está normalmente associado à sua idade, uma vez que, consoante a raça, cada vaca deve começar a sua vida reprodutiva na mesma altura e ter uma gestação por ano. No presente estudo, limitou-se o número de lactações, entre 1 a 4 lactações por vaca, de modo que cada grupo em estudo seja o mais uniforme possível. Isto é importante porque em alguns estudos anteriores constatou-se a diferença nos resultados reprodutivos entre novilhas (0 lactações), primíparas (1 lactação) e múltiparas (2 ou mais lactações), apesar de não serem consensuais pois Lamb *et al.* (2006) e Lamb (2013) defendem que TC são maiores em vacas múltiparas enquanto que Stevenson *et al.* (2003) afirma o contrário pois vacas primíparas retornam menos ao cio, o que também se verificou no presente trabalho. Por outro lado, há vários autores (Cavalieri, 2004; Taponen, 2009; Escalante *et al.*, 2013) que defendem que não há relação entre esses fatores ou que é mínima para ser relevante. Conclui-se mostrando que o fator da paridade ainda não é consensual e que é necessário mais estudos futuros para uma boa conclusão neste tema.

4.3.3. Resultados obtidos vs. Intervalo Parto-Protocolo

O intervalo Parto-IA é um dos mais importantes quando se quer implementar um protocolo de sincronização uma vez que depende deste intervalo de tempo o seu início, de modo que se obtenha a máxima eficácia em cada animal.

No presente estudo, observaram-se vacas a partir dos 50 dias pós-parto, estando este número no limite inferior aconselhado por diversos autores (Lamb *et al.*, 2001; Larson, 2006; Escalante *et al.*, 2013), que defendem que qualquer vaca só deve ser inseminada com um mínimo de 50 dias pós-parto, apesar de ainda existir uma margem com o tempo de protocolo realizado até à inseminação. Quanto maior for este período de tempo, mais tempo o animal tem para sofrer a involução uterina necessária a uma nova gestação, bem como de ultrapassar o período de anestro pós-parto, comum em todas as fêmeas bovinas, para assim se obter uma maior TC. Contudo, o objetivo será sempre diminuir este período ao máximo, de modo que os animais fiquem novamente gestantes para se cumprir o principal objetivo de qualquer exploração que é ter uma gestação por ano por vaca.

O número de inseminações já realizadas pode estar relacionado com o intervalo parto-protocolo uma vez que na exploração estudada, as vacas começam um protocolo reprodutivo ou são inseminadas a partir dos 60 dias pós-parto. Assim, foram apenas escolhidas vacas em que já tivessem sido realizadas até 2 IA, de modo que não fossem muito diferentes no seu estado reprodutivo.

No entanto, este parâmetro não está diretamente relacionado com a TC nem com os resultados obtidos, uma vez que no presente estudo não se conseguiu estabelecer esta relação. Esta informação pode ser valorizada se as inseminações realizadas anteriormente forem com o auxílio de protocolos reprodutivos, nomeadamente protocolos de pré-sincronização (Thatcher *et al.*, 2006) que preparam o animal hormonalmente para estar no período cíclico pretendido no início dum protocolo de sincronização.

4.3.4. Resultados obtidos vs. Manifestação comportamental de cio

Para a realização do protocolo escolhido não era necessário a observação de cio uma vez que foi realizada IATF. No entanto, optou-se por tirar o máximo de dados possíveis (tabela 4), percebendo até que ponto a IA estaria a ser efetuada na hora correta uma vez que não se realizou uma segunda administração de GnRH no fim do protocolo, como alguns autores aconselham (Lamb *et al.*, 2001; Hittinger *et al.*, 2004).

A taxa de deteção de cio na exploração é baixa (54,9%) e o mesmo se verificou neste estudo em que no total da amostra, foi apenas de 35% (7 vacas detetadas por observação

direta e/ou pelo podómetro). Este valor é inferior ao estudado por Martínez *et al.* (2000) que num protocolo semelhante, também com o uso de GnRH, obteve uma taxa de deteção de cio de 55% e uma TC de 48%, atribuindo este baixo valor à ovulação prematura devido ao pico de LH induzido pela GnRH, ainda antes das concentrações de estrogénios periferal estarem elevadas.

Entre os dois grupos em estudo não se verificou uma diferença significativa entre as taxas de deteção de cio. Para o Grupo Controlo obteve-se uma taxa de 40%, onde se detetaram 3 animais pela observação direta e mais um através do podómetro. Para o Grupo Tratamento obteve-se uma taxa de deteção de cio de 30%, onde 2 vacas manifestaram comportamento de cio e foram também detetadas pelo podómetro e mais um animal que foi detetado unicamente pelo podómetro. Utilizando-se os resultados do DG precoce em que se admite que os duvidosos são positivos, dos animais que ficaram gestantes não se encontra uma correlação entre os que se detetaram em cio, uma vez que para o Grupo Controlo, das 4 vacas que fizeram cio, apenas 2 ficaram gestantes; para o Grupo Tratamento, das 3 detetadas em cio, apenas 2 tiveram uma gestação positiva. Apenas um animal em cada grupo do estudo ficou gestante sem ter manifestado comportamento de cio pelo que podemos deduzir que as taxas de conceção são maiores quando a IA é realizada a cio observado do que quando é realizada a tempo fixo. Contudo, a taxa de prenhez é maior com IATF porque já inclui no seu cálculo a deteção de cio, sendo este o maior problema em qualquer exploração, resultados corroborados noutros estudos (Ambrose *et al.*, 2008; Rudolph *et al.*, 2011). Na exploração foi encontrado este problema de depender de uma pessoa técnica e capaz para fazer unicamente observação de cio três vezes por dia, sendo apenas feita enquanto decorrem os outros trabalhos normais. Para o presente estudo foi necessário e realizou-se esta observação, mas ainda assim, devido à distribuição dos animais por vários parques e devido também à distância entre eles, pode ter tido falhas não sendo totalmente fiável.

Quanto ao podómetro, o outro método utilizado pela exploração para identificação de comportamento de cio, detetou-se que apenas 35% dos animais em estudo o possuíam por já ter existido problemas antigos na exploração com a utilização deste método, sendo eles devido ao programa informático, ao demorado estabelecimento padrão de cada vaca e à perda dos dispositivos pelas vacas, não sendo por isso muito valorizado e sendo esse o motivo para nem todas as vacas o possuírem. Todavia, ainda foi possível determinar que estava em cio mais uma vaca em cada um dos grupos em estudo, e confirmar mais duas vacas no grupo tratamento que já tinham sido observadas com este comportamento, sendo por isso uma importante ferramenta para o estudo.

4.3.5. Resultados obtidos vs. Manifestações físicas e morfológicas de cio

Para além da observação do comportamento de cio, verificou-se também três sinais secundários de cio à palpação retal no dia da IA, ou seja, D9 e D10 para as vacas do grupo controlo e do grupo tratamento, respetivamente (Tabela 4).

A tonicidade do útero foi avaliada pela sua tonicidade e reatividade em três parâmetros diferentes. Estes parâmetros estão estudados por outros autores que numa vaca em cio determinaram o mesmo que o parâmetro designado “3” neste estudo, ou seja, que o útero estaria tónico e reativo (Ball & Peters, 2004; Noakes *et al.*, 2009). Os resultados observados mostram que no grupo controlo determinaram-se 5 animais com esta manifestação ideal, mas apenas um destes foi diagnosticado com uma gestação duvidosa; todos os outros estavam negativos no DG precoce, obtendo-se 5 animais com DG final negativo. No grupo tratamento por outro lado, verificaram-se 8 animais com esta característica e destes diagnosticaram-se 5 animais gestantes no DG precoce, dos quais 3 resultaram efetivamente numa gestação.

A produção de muco no trato reprodutivo deve-se a um aumento do fluxo de sangue que estimula a produção do muco pelas células da vagina e do cérvix (Ball & Peters, 2004). É consensual em toda a comunidade científica que a produção de muco translúcido e viscoso está diretamente relacionado com o cio (Nebel, 2003; Ball & Peters, 2004; Noakes *et al.*, 2009). O entrave encontrado é o de que este intervalo, em que a presença de muco é visível, é demasiado extenso para que se consiga definir o início do cio e, consequentemente, o momento da ovulação e ideal para a IA. Noakes *et al.*, (2009) afirma que esta produção de muco começa um dia antes do início do cio e prolonga-se até 4 dias após este terminar. Assim, das 7 vacas observadas no grupo controlo, apenas uma não apresentou muco translúcido. No grupo tratamento, 5 vacas em 8 apresentaram grande quantidade de muco translúcido. Este pequeno número de vacas que não apresentam muco pode dever-se ao fato de estas já o terem perdido (Ball & Peters, 2004) significando que o pico de cio possa já ter terminado. Isto vai de encontro aos resultados obtidos uma vez que nenhuma das vacas onde se verificou a ausência de muco ter ficado efetivamente gestante, uma vez que este também é necessário no momento de IA ou cópula, criando o ambiente necessário aos espermatozóides. Uma das vacas que não foi detetada com muco foi diagnosticada com gestação duvidosa, embora se tenha confirmado como negativa no DG final.

A abertura do cérvix é óbvia e essencial nesta fase do ciclo éstrico mas por vezes, devido a lesões antigas ou problemas funcionais, a sua abertura não é completa. Dos animais registados, apenas três se encontravam nesta situação menos ideal em que o problema pode

ser apenas uma inseminação mais demorada, pois pode-se tornar mais difícil passar com o pistoleio todas as pregas do cérvix. Quando isto não é conseguido, o sémen também pode ser deixado no cérvix, uma vez que é este o local de depósito quando uma cópula acontece (Morrell & Rodriguez-Martinez, 2010). Apesar disso, o local ideal de depósito de sémen por IA é o colo do útero pois é onde se observa uma maior taxa de fertilidade (Ball & Peters, 2004; Selk, 2002). No presente estudo, uma das vacas que foi inseminada apenas no cérvix ficou gestante, sendo por isso, esta anomalia morfológica importante mas não impeditiva para a realização de IA.

Conclui-se que não é conveniente o uso de apenas um destes parâmetros de detecção de cio pois só com uma observação crítica do indivíduo, é que se consegue tirar algum pressuposto e que mesmo nesse caso, existem muitos outros fatores que contribuem para a falha ou não da gestação num animal.

4.3.6. Resultados obtidos vs. Resultados Ecográficos

No presente estudo, apesar de não ser possível determinar com exatidão o momento da ovulação, pois não foram recolhidas amostras de sangue ou de leite para determinação das concentrações de progesterona (Lamb *et al.*, 2001; Hittinger *et al.*, 2004; Rudolph *et al.*, 2011), conseguiu-se perceber pelas ecografias realizadas a cada animal, se ocorreu ovulação, que outras alterações decorreram nas gónadas e explicá-las com o auxílio da literatura existente.

Foram realizadas ecografias transretais no dia de início do protocolo (D0), no dia de retirada do dispositivo libertador de progesterona (D7) e no dia de inseminação (D9 ou 10 para o grupo controlo e tratamento, respetivamente) para acompanhar estas alterações. Era esperado que a administração da hormona GnRH no dia 0, fosse atuar em todas as vacas que apresentassem um folículo suscetível a esta hormona, normalmente com um diâmetro superior a 8 mm (DesCôteaux *et al.*, 2010). Formar-se-ia então um CL que libertaria progesterona, até à administração de PGF_{2α}, à qual o CL é sensível a partir do 7º dia, iniciando-se a sua regressão. No caso de já estar presente um CL no ovário no dia 0, colocou-se o dispositivo de libertação de progesterona (CIDR) de modo que esse CL não regredisse antes do tempo pretendido e consequentemente, ocorresse uma ovulação a meio do protocolo. Assim, todas as vacas ficariam sincronizadas até ao dia 7 onde, com a retirada do CIDR e com a administração da PGF_{2α}, o folículo selecionado na segunda onda folicular ovularia, podendo ocorrer fecundação pois a inseminação foi efetuada 72 horas após a PGF_{2α}. A diferença

efetuada na hora de administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ não acarretou diferenças significativas entre os dois grupos em estudo no que respeita às alterações decorridas nas gónadas (Tabela 5 e 6).

No entanto, o animal é um conjunto de sistemas que não funcionam por si só mas que estão interligados e que dependem uns dos outros e que, por isso, nem sempre se observou o resultado esperado, que é em última instância a gestação, nem mesmo quando as condições em que os órgãos se encontravam serem as previstas.

No animal designado por C1, observou-se que este possuía num dos ovários alguns folículos imaturos e no outro um CL. Nas ecografias seguintes, observou-se que os folículos cresceram e que o CL diminuiu não havendo indícios de já ter ocorrido ovulação, pois o folículo dominante continuava presente, justificando por isso o fato de a vaca não ter ficado gestante. Neste animal, seria importante realizar a observação de cio nos próximos dias esperando que a ovulação ocorresse a qualquer momento.

Na vaca C2, observou-se que terá ocorrido ovulação pelo ovário direito com a administração de GnRH no D0, uma vez que na segunda ecografia surge um CL. No outro ovário existia um CL no primeiro dia, observando-se depois a sua regressão e o aparecimento e crescimento de um folículo. No D9, dia da IA, este folículo possuía tamanho suficiente para ovular, condição que ainda não teria acontecido no momento da ecografia mas que, pelo resultado obtido de gestação, sabemos que se verificou. Isto é possível uma vez que o semén no interior do animal fica viável durante 24 a 48 horas, variação grande uma vez que depende quer da qualidade do sémen, bem como da sua preparação para a IA (UNAM, 2007).

No animal C3, apesar de não se ter registo da última ecografia consegue-se perceber que pela ação da GnRH administrada no dia 0, obteve-se o efeito esperado ocorrendo a ovulação e aparecendo um CL visualizado no dia 7 no ovário esquerdo. Neste mesmo dia, já deveria ser perceptível a ocorrência da nova onda folicular através de um folículo de pelo menos 8 mm, o que não se verificou. Isto pode dever-se à falta de visualização de todo o ovário ou de que pela ação da progesterona o folículo pequeno que se encontrava no ovário direito ainda não ter tido a oportunidade de crescer. Pensa-se que isto possa ter acontecido nos dias seguintes, estando em condições de ser fecundado no dia da IA uma vez que no DG precoce obteve-se um resultado de gestação duvidosa, concluindo-se no entanto negativa na confirmação da gestação.

A vaca designada C4, possuía um CL no dia 0 e na ecografia seguinte foi perceptível a sua luteólise com aparecimento de um folículo dominante. No D9, constatou-se o crescimento deste mesmo folículo, encontrando-se num estadio óptimo para ser fecundado, o que se

traduziu em gestação. A confirmação de gestação deste animal porém já teve um resultado diferente, podendo-se pressupor que neste caso se tratou de reabsorção embrionária.

A vaca C5, no dia da primeira ecografia, tinha um CL no ovário direito que talvez pelo seu tempo de presença avançado sofreu luteólise, entre o D0 e o D7. No ovário esquerdo, registou-se a presença de um folículo que ovulou talvez devido à administração de GnRH, formando um CL e desencadeando uma nova onda de crescimento folicular. Esta proporcionou o crescimento de folículos viáveis para a ovulação nos dois ovários, registrando-se a presença de dois folículos maiores que 1,8 cm que segundo DesCôteaux *et al.* (2010) são folículos maduros, não podendo coexistir dois no mesmo momento no mesmo animal. Pode-se então especular que ocorreu um erro de leitura, tratando-se talvez de um CL em vez do folículo registado. O mesmo autor refere ainda que excepcionalmente pode existir o recrutamento de dois folículos, o que dará origem a gémeos se ambos forem inseminados, podendo ser também esta uma justificação para o presente caso. Com este animal, conseguimos perceber que não só o tamanho dos folículos é importante, uma vez que se considerava um tamanho excelente mas que acabou por não ficar gestante por qualquer outra razão.

No animal C6 não se realizou a ecografia de D7, mas consegue-se perceber que este animal ovulou do ovário direito uma vez que tinha um folículo num estadio ideal aquando da primeira ecografia e no D9 aparecia no mesmo ovário um CL. No ovário esquerdo, neste mesmo dia 9, ecografia correspondente à inseminação, detectou-se um CL hemorrágico pelo que tirou-se imediatamente a conclusão de que este animal não ficaria gestante uma vez que já teria ocorrido a ovulação antes da IA, realizada após esta manipulação dos animais.

Do animal identificado como C7 não se consegue tirar nenhuma conclusão relativamente ao objetivo final, se ficará gestante ou não, uma vez que também ocorreu uma falha no registo da observação ecográfica de D9. No entanto, ainda se consegue deduzir que com a GnRH administrada no D0 obteve-se o efeito esperado, tendo sido selecionado um folículo e sendo observado o seu crescimento na ecografia de dia 7.

A vaca C8 possuía no início de tratamento as condições ideais para este protocolo. Tinha várias estruturas foliculares prontas a serem selecionadas por uma nova onda folicular e tinha ainda um CL, pelo que a colocação do CIDR contribuiu apenas para que este se mantivesse numa fase estável até à administração da PGF_{2α} e à retirada do dispositivo. No D7 verificou-se que este crescimento folicular tinha ocorrido e ainda a presença do CL como era esperado, mas no D9 não se observou um novo CL, como seria de esperar com a ovulação decorrida recentemente, nem um folículo pré-ovulatório que teria grande tamanho e que seria

suposto ovular nas seguintes 24 horas para que o sémen da IA ainda fosse viável no interior da vaca.

O bovino designado por C9 ovulou depois da administração de GnRH mas não voltaram a crescer estruturas suficientes nesse ovário para que pudesse haver uma segunda ovulação que originasse em gestação. No início do protocolo, este animal tinha complementarmente pequenos folículos que cresceram muito lentamente, podendo estar também imaturos para a ovulação no dia pretendido, D9.

A última vaca do grupo controlo, C10, tinha o ovário esquerdo muito pequeno e por isso deduziu-se que este estivesse parado; por outro lado, as estruturas observadas no ovário direito, nas três ecografias realizadas, vão de encontro ao que era esperado, uma vez que no primeiro dia a vaca apresentava um folículo e um CL. Deduziu-se que esse folículo tenha ovulado devido à administração de GnRH e que tenha ocorrido concomitantemente o crescimento de um novo folículo. No D6 com a administração de PGF_{2α} e no D7 com a retirada do CIDR assumiu-se que o CL regrediu, possibilitando a ovulação próxima à IA do novo folículo que entretanto já se encontra grande e maduro (1,2 cm), observando-se neste dia, D9, um CL recente, obtendo-se como resultado final, uma gestação positiva.

A vaca do Grupo Tratamento designada por número 1, no primeiro dia do protocolo apresentava no ovário direito um CL cavitário, que significa que a ovulação teria ocorrido há pouco tempo, até há 10 dias, segundo DesCôteaux *et al.* (2010). Observou-se a presença de mais folículos de tamanho superior a 1 cm o que é pouco provável sem tratamentos hormonais, que só foram realizados posteriormente a esta visualização, uma vez que no ciclo éstrico normal, apenas um folículo é selecionado para ser dominante e amadurecer a fim de que este ovule (DesCôteaux *et al.*, 2010). Assim, pressupõe-se que as ecografias possam não ter sido realizadas corretamente ou que o registo das mesmas não corresponda ao observado. Nos dias seguintes, este animal estava em condições ideais para ficar gestante uma vez que no dia da IA tinha um folículo maior que 1 cm, ou seja, já maduro o suficiente para ovular. Neste caso, teria sido ideal a administração de uma dose de GnRH externa a fim de aumentar a probabilidade de isso acontecer.

A vaca designada por T2 possuía na primeira ecografia dois folículos grandes, um em cada ovário, que à semelhança da vaca anterior, pode ter sido mal observado ou mal registado. Pressupõe-se que o folículo do ovário esquerdo tenha ovulado com a administração de GnRH, surgindo um CL e possibilitando o crescimento do folículo no outro ovário. Este já não se encontra presente na 3ª ecografia e embora não se tenha observado o CL correspondente,

pensa-se que terá ovulado entre estas duas manipulações, podendo o óvulo ainda estar em condições para ser fecundado, obtendo-se o resultado no diagnóstico de gestação duvidoso.

No ovário esquerdo do animal T3, no dia 0, existia um bom folículo que possivelmente ovulou devido à administração de GnRH, tornando-se em CL e dando oportunidade a uma nova onda folicular para progredir, o que não se verificou. No ovário direito, as estruturas existentes não se alteraram ao longo dos 10 dias de tratamento talvez pelo motivo da existência de um CL recente no ovário contralateral, ou seja, manteve-se a concentração plasmática de progesterona elevada, devido também à utilização do CIDR, devendo ocorrer desenvolvimento folicular simultaneamente, o que também neste ovário não se verificou. Esta vaca não apresentou manifestação nem sinais físicos de cio, mesmo sendo uma das monitorizadas também por podômetro. Sendo a primeira IA após o parto, pensa-se que este animal ainda não estivesse em condições fisiológicas normais, nomeadamente hormonais, capazes de reagir corretamente aos tratamentos efetuados, não se observando os resultados esperados. Comprova-se neste animal, a discussão ainda existente na comunidade científica, relacionada com o período voluntário de espera (PVE), uma vez que para esta vaca o parto já teria decorrido há 64 dias, contudo ela ainda não estaria pronta.

O ovário direito da vaca T4 encontrava-se no dia 0 com muita atividade, tendo-se observado um CL e um folículo com 1,5 cm. Ao realizar a ecografia no dia 7 percebemos que possivelmente não ocorreu ovulação uma vez que se encontra um folículo de 2,2 cm e que se manteve o CL com o auxílio do CIDR que foi colocado. Pensa-se que este folículo irá ovular, devido ao seu tamanho e à retirada do estímulo de progesterona quer externa quer do CL devido à administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ que fará ocorrer a luteólise. Nesta vaca teria sido importante não deixar passar o momento ideal de inseminação que deveria ter sido logo no mesmo dia, 12 horas após a retirada do CIDR. Como foi realizado um protocolo de inseminação a tempo fixo, não se observou gestação nesta vaca, talvez por estes motivos.

A vaca T5 apresentava o ovário esquerdo em estado estacionário que nem com a estimulação hormonal se modificou. No ovário contralateral, na primeira ecografia, apresentava um folículo maduro capaz de ovular com a administração de GnRH efetuada. Com a observação do D7, pode-se concluir um de dois resultados: o folículo maduro presente no D0 ovulou, dando origem a um novo CL e possibilitando o crescimento de um novo folículo dominante; ou a administração de GnRH não foi suficiente para provocar a ovulação no primeiro folículo, apenas para este se desenvolver e com a colocação do CIDR, o CL já existente também no D0 foi capaz de manter os níveis de progesterona altos. Qualquer que tenha sido o desenvolvimento do ciclo éstrico nesta vaca, o folículo observado no D7 estava

em condições para sofrer ovulação e haver fecundação quando a vaca fosse inseminada. O DG foi duvidoso pelo que se pode deduzir que as condições do embrião gerado não eram as ideais. Isto pode estar relacionado com a segunda hipótese colocada, uma vez que folículos com demasiado tempo podem não ser viáveis (Ball & Peters, 2004).

No animal designado T6, na primeira ecografia, visualizou-se no ovário direito um folículo que, pelo seu estado de maturação, respondeu ao tratamento hormonal efetuado, observando-se na ecografia seguinte a existência de um CL. Com a administração de PGF_{2α}, este sofreu luteólise para que o novo folículo observado no dia 7 com 1,5 cm, fosse capaz de ovular de modo que a vaca ficasse gestante com a IA de dia 10. No entanto, nesse dia, apenas se observou um CL deduzindo-se que a ovulação teria ocorrido demasiado cedo, comparativamente à IA. O ovário esquerdo estaria em fase estacionária no dia 0 mas com a estimulação hormonal, percebe-se que retornou a ciclar, aparecendo na última ecografia com um folículo de tamanho suficiente para ovular, supondo que tenha sido este a dar origem à gestação positiva verificada no DG.

A vaca T7 ficou gestante com o protocolo embora a sua morfologia ovárica visualizada por ecografia ao longo dos dias do tratamento não seja a típica esperada. No primeiro dia observou-se no ovário direito um folículo maduro, com 2 cm e no ovário esquerdo um CL. Seria de esperar que com a administração de GnRH e com a colocação do CIDR, que o folículo ovulasse dando origem a um CL, o que não foi observado na segunda ecografia. No entanto, como o folículo maior deixou também de ser observado, é de esperar que a ovulação tenha ocorrido. Decorrente com estes acontecimentos, deveria ter-se formado uma nova onda folicular, podendo-se observar na segunda ecografia um folículo em crescimento, ou até mesmo na terceira ecografia, ainda um folículo maduro. É provável que, apesar de estas estruturas não serem perceptíveis por visualização, de fato, essa onda folicular tenha ocorrido e que um folículo tivesse ovulado talvez entre o dia 7 e o dia 10 de protocolo, para que pudesse ser possível a fertilização no dia 10 quando foi realizada a IA. Confirmou-se que isto pode ter acontecido entre as 19 horas do dia 8 e as 7 horas do dia 9 uma vez que neste mesmo dia se registou um pico de atividade no podómetro deste animal.

Nos ovários da vaca T8 encontrava-se um corpo lúteo cavitário no dia da primeira ecografia que segundo o esperado se manteve durante os 7 dias de utilização do CIDR e ainda mantinha a cavidade visível. No dia 7, dia da segunda ecografia, observou-se também um folículo que poderia ser o mesmo que já se tinha observado no primeiro dia de protocolo e que com a administração de GnRH se deveria ter desenvolvido e crescido até estar maduro, de modo que ovulasse com a administração de PGF_{2α}, o que de fato se verificou uma vez que na

ecografia de dia 10, visualizou-se uma depressão ovulatória no local onde deveria estar o folículo maduro. Esta depressão é resultado de uma ovulação recente, precursora do corpo hemorrágico e do corpo de lúteo (UNAM, 2007). Este animal tinha todas as condições para ter ficado gestante, diagnosticando-se duvidoso precocemente mas que não se verificou positivo na confirmação da gestação, talvez porque o período de embriogénese é muito propício à perda da gestação e consequentemente à morte embrionária.

As alterações hormonais ocorridas na vaca designada por T9 foram as esperadas, tendo como resultado final dado origem a uma gestação. Na primeira ecografia, no ovário esquerdo apenas se observou um pequeno folículo, mas ao contrário deste, no ovário direito visualizaram-se várias estruturas, indicando um ovário muito ativo. Contudo, ao contrário do que se esperava, parece ter sido do ovário esquerdo que ocorreu a ovulação consequente da administração da GnRH, uma vez que no dia 7 observou-se um CL que não existia na primeira ecografia, enquanto que as alterações observadas no ovário direito apenas evidenciaram o crescimento folicular, consequente também da administração da GnRH. No dia da IA, o ovário direito estava no estado ideal para esse procedimento uma vez que tinha vários folículos maduros possíveis de ovulação, talvez devido à estimulação hormonal ocorrida.

A vaca T10 possuía no dia 0 do protocolo um CL e um folículo grande que não se pode comprovar que ovulou, uma vez que na segunda ecografia se observou um CL que pode ter sido o originado desse folículo grande ou o CL mantido pelo auxílio do CIDR. Consegue-se no entanto perceber que a GnRH atuou como fator de crescimento e seleção do folículo dominante uma vez que é observado no D7 um folículo maior do que o observado anteriormente. Este já teria tamanho suficiente para responder ao pico de LH criado pela retirada do CIDR, o que é possível ter acontecido uma vez que no dia 10, observou-se neste mesmo ovário um CL talvez originado dessa ovulação. A razão pela qual este animal não ficou gestante talvez se deva a esta ovulação ter acontecido demasiado cedo para a IATF.

Percebeu-se que seria necessário algo que sincronizasse a ovulação que daria origem à fecundação, o que já foi realizado por diversos autores, ao administrar mais uma dose de GnRH no momento da IA (Lamb *et al.*, 2001) ou 16 horas antes da IA (Ambrose *et al.*, 2008; Madureira *et al.*, 2004).

4.4. Aspetos positivos e negativos do estudo

Um dos aspetos negativos detetados logo no início do trabalho, foi a utilização de um número limitado de animais, uma vez que foram disponibilizados poucos medicamentos para

utilização e realização do estudo. Assim, percebeu-se que o estudo não teria valor estatístico significativo, sendo importante a recolha de todas as informações sobre os animais escolhidos, para dar valor descritivo ao mesmo. Também noutros trabalhos já publicados percebeu-se que o mesmo decorreu, devendo-se apenas analisá-los com um espírito crítico (Moreira *et al.*, 2000; Hittiger *et al.*, 2004; Ambrose *et al.*, 2008; Mantovani *et al.*, 2010).

Para complementar a análise reprodutiva destes animais, poder-se-ia ter recolhido sangue diariamente para medição da concentração plasmática de progesterona. Admitindo que com a colocação do CIDR esta concentração estaria alta, as recolhas deveriam ter sido efetuadas entre os dias de protocolo 7 a 10 para o grupo controlo e de 7 a 11 para o grupo tratamento, a fim de corroborar os dados recolhidos ecograficamente, determinando o momento exato da ovulação e assim se poder justificar a IATF (Moreira *et al.*, 2000; Hittinger *et al.*, 2004).

Esta mesma análise poderia também ter sido realizada no primeiro dia de protocolo (D0) para complementar o perfil reprodutivo das vacas escolhidas, auxiliando na determinação do estado cíclico de cada animal antes ainda de realizar alterações hormonais. As primeiras ecografias realizadas, apesar de terem este mesmo objetivo, não o permitem concretizar com tanta precisão como a análise sanguínea. Para o presente estudo apenas seria uma informação adicional, uma vez que o desenho do protocolo já estava pré-estabelecido, mas na atividade normal das explorações esta seria uma análise interessante pois conforme o resultado de cada vaca, poder-se-ia decidir qual o protocolo mais adequado (Hittinger *et al.*, 2004; Ambrose *et al.*, 2008).

5. Conclusão

Qualquer programa eficaz de controlo do ciclo éstrico deve proporcionar uma frequência alta e previsível de cios e resposta ovulatória, de modo que a concepção seja possível com uma única inseminação artificial (IA) pré-programada. Com este trabalho, percebeu-se que, embora o número da amostra não permita uma conclusão significativa, é possível realizar a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$ concomitante com a retirada do CIDR, não se tendo obtido uma grande vantagem comparativamente com a administração deste fármaco 24 horas antes. Isto significa que a utilização deste protocolo é possível, obtendo-se o benefício da realização de menos uma manipulação nos animais e com isto, um aumento no bem estar dos mesmos e consequentemente no seu nível reprodutivo. No entanto, é necessário uma contínua avaliação do método, uma vez que nos resultados gerais se obtiveram taxas de concepção (TC) muito baixas de acordo com o esperado.

A exploração estudada, apesar de ter algumas deficiências no campo reprodutivo, tais como o número de IA por vaca até que esta fique gestante, levando a uma TC muito baixa, ou na idade à 1ª IA e no tempo voluntário de espera, continua a ser uma exploração rentável, tendo este estudo, fornecido mais um protocolo reprodutivo a ser utilizado por esta, de modo a rentabilizar a mão de obra e diminuir os custos logísticos.

Com a recolha ecográfica realizada, este estudo permitiu concluir que o protocolo reprodutivo foi eficaz porque a grande maioria das vacas no dia 7 de protocolo, dia da retirada do CIDR, apresentavam um corpo de lúteo (CL) de tamanho suficiente para ser responsivo à $\text{PGF}_{2\alpha}$. No dia da IA mais de 60% das vacas apresentavam um folículo maior que 1 cm pelo que os fracos resultados obtidos deveram-se à falha da fertilidade e não do método reprodutivo.

Com este estudo, conclui-se também, que no caso de uma exploração bovina de carne, quando são utilizados métodos reprodutivos, é uma mais valia a utilização de um dispositivo de libertação de progesterona, uma vez que não se sabe o estado cíclico das vacas e que com a sua aplicação podemos contornar este problema.

Como nota final, deve-se atentar que a escolha de um protocolo tem de ser sempre dependente da recetividade do produtor, pois a sua eficácia resulta essencialmente da sua compreensão e rigorosa aplicação

Bibliografia

Ambrose, D. J., Emmanuel, D. G., Colazo, M. G. & Kastelic, J. P. (2008). Short Communication: Pregnancy Rates to Timed Artificial Insemination in Holstein Heifers Given Prostaglandin F2 α Twenty-Four Hours Before or Concurrent with Removal of an Intravaginal Progesterone-Releasing Insert. *J Dairy Sci.* 91:2678–2683

Apifarma (Associação Portuguesa da Industria Farmacêutica)/CESA (2007). Simposium Veterinário 2007/2008. Lisboa: Apifarma1

Ball, P. J. & Peters, A. R. (2004). Reproduction in cattle. (3^a Ed). United Kingdom: Blackwell Publishing

Baruselli, P. S., Bó, G. A., Reis, E. L. & Marques, M. O. (2004). Inseminação Artificial em Tempo Fixo em Bovinos de Corte. Comunicação apresentada no 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Brasil

Baruselli, P. S., Jacomini, J. O., Sales, J. N. S. & Crepaldi, G. A. (2008). Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. Comunicação apresentada no 3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Brasil

Baruselli, P. S., Sales, J. N., Sala, R. V., Vieira, L. M. & Sá Filho, M. F. (2012). History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. *Anim Reprod*, 9-3, 139-152

Boersema, S.-J., Silva, J. C., Mee, J., Noordhuizen, J. (2010). Farm health and productivity management of dairy young stock (1ªEd.). Netherlands: Wageningen Academic Publishers

Caldow, G., Lowman, B. & Riddell, I. (2005). Veterinary intervention in the reproductive management of beef cow herds. *In Practice*, 27, 406-411

Cavalieri, J. (2004). Induction of ovulation *Bos Indicus* and *Bos Taurus* cattle following synchronization of oestrous cycles with emphasis on australian studies. Comunicação apresentada no 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Brasil

Cavalieri, J., Hepworth, G., Fitzpatrick, L. A., Shephard, R. W. & Macmillan, K. L. (2006). Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. *Theriogenology*, 65, 45–64

Cooke, R. F., Arthington, J. D., Austin, B. R. & Yelich, J. V. (2009). Effects of acclimation to handling on performance, reproductive, and physiological responses of Brahman-crossbred heifers. *J Anim Sci*, 87:3403-3412

Cunningham, J. G. (2004). Tratado de Fisiologia Veterinária (3ªEd.). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan

DesCôteaux, L., Gnemmi, G. & Colloton, J. (2010). Practical atlas of ruminant and camelid reproductive ultrasonography (1ªEd.). USA: Wiley-Blackwell

Direcção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV; 2009). Medicamentos veterinários autorizados Janeiro de 2014. Acedido em 21 Janeiro 2014 em <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=17157&generico=150159&cboui=150159>

Escalante, R. C, Poock, S. E., Mathew, D. J., Martin, W. R., Newsom, E. M., Hamilton, S. A., Pohler, K. G. & Lucy, M. C. (2013). Reproduction in grazing dairy cows treated with 14-day controlled internal drug release for presynchronization before timed artificial insemination compared with artificial insemination after observed estrus. *J Dairy Sci*, 96:300–306

Grajales, H. & Valencia, J. (2008). Alteraciones del aparato genital de la hembra. In: C. Galina & J. Valencia (Eds.), *Reproducción de animales domésticos* (3ªEd., pp. 281-312). México: Limusa

Hittinger, M. A., Ambrose, J. D. & Kastelic, J. P. (2004). Luteolysis, onset of estrus, and ovulation in Holstein heifers given prostaglandin F_{2α} concurrent with, or 24 hours prior to, removal of an intravaginal, progesterone-releasing device. *Can J Vet Res*, 68:283–287

Hopkins, S. M. & Evans, L. E. (2003). Artificial Insemination. In: M. Pineda & M. P. Dooley (Eds.), *McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction* (5ªEd., pp. 341). Iowa: State Press

Instituto Nacional de Estatística (INE), I. P. (2011). Recenseamento Agrícola 2009 – Análise dos principais resultados. Portugal: Lisboa

Lamb, G., Stevenson, J., Kesler, D., Garverick, H., Brown, D. & Salfen, B. (2001). Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F_{2α} for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J Anim Sci*, 79:2253-2259.

Lamb, G., Larson, J., Geary, T., Stevenson, J., Johnson, S., Day, M. *et al.* (2006). Synchronization of estrus and artificial insemination in replacement beef heifers using gonadotropin-releasing hormone, prostaglandin F_{2α}, and progesterone. *J Anim Sci*, 84:3000-3009.

Lamb, G. C. (2013). Controlo of estrus in cows. Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle: Staunton, VA

Larson, J., Lamb, G., Stevenson, J., Johnson, S., Day, M., Geary, T. *et al.* (2006). Synchronization of estrus in suckled beef cows for detected estrus and artificial insemination and timed artificial insemination using gonadotropin-releasing hormone, prostaglandin F_{2α}, and progesterone. *J Anim Sci*, 84:332–342

Lee, J. & Kim, I. (2007). Pregnancy loss in dairy cows: the contributing factors, the effects on reproductive performance and the economic impact. *J Vet Sci*, 8(3):283,288

Madureira, E. H., Pimentel, J. R., Almeida, A. B. & Rossa, L. A. (2004). Sincronização com progestágenos. Comunicação apresentada no 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Brasil

Mantovani, A. P., Nichi, M., Sá Filho, M. F., Ayres, H., Vettorato, L. F., Bó, G. A. & Baruselli, P. S. (2010). Follicular growth and plasma progesterone patterns in *Bos indicus* x *Bos taurus* heifers submitted to different PGF2 α /progesterone-based synchronization protocols. *Anim Reprod*, 7(2):91-96

Manual Merck de Veterinária (2007). Diagnóstico por la imagen (6ª ed). Barcelona, España: Oceano / Centrum Merial

Martínez, M., Kastelic, J., Adams, G., Janzen, E., McCartney, D. & Mapletoft, R. (2000). Estrus synchronization and pregnancy rates in beef cattle given CIDR-B, prostaglandin and estradiol, or GnRH. *Can Vet J*, 41:786-790

Moreira, F., de la Sota, R. L., Diaz, T. & Thatcher, W. W. (2000). Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *J Anim Sci*, 78:1568–1576

Morrell, J. M. & Rodriguez-Martinez, H. (2010). Practical Applications of Sperm Selection Techniques as a Tool for Improving Reproductive Efficiency. *Veterinary Medicine International*

Nebel, R. L. (2003). Components of Successful Heat Detection Program. *Advances in Dairy Technology*: 15:191-203.

Noakes, D. E., Parkinson, T. J. & England, G. C. (2009). Veterinary Reproduction and Obstetrics (9ªEd.). Saunders Elsevier

O'Connor, M. & Peters, J. (2003). Artificial Insemination Technique. College of agricultural sciences, Pennsylvania State University

Perry G. A. & Perry B. L. (2009). GnRH treatment at artificial insemination in beef cattle fails to increase plasma progesterone concentrations or pregnancy rates. *Theriogenology*, 71:775-779

Ptaszynska, M. (2007). Compêndio de reprodução animal (9ªEd). Intervet

Rudolph, J., Bruckmaier, R. M., Kasimanickam, R., Steiner, A., Kirchhofer, M., Hüsler, J. *et al.* (2011). Comparison of the effect of a CIDR-Select Synch versus a long-term CIDR based AI protocol on reproductive performance in multiparous dairy cows in Swiss dairy farms. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9:151

Sá Filho, O. G. & Vasconcelos, J. L. (2011). Treatments to optimize the use of artificial insemination and reproductive efficiency in beef cattle under tropical environments. *Veterinary Medicine International*

Santos, J. E., Galvão, K. N., Cerri, R. L., Chebel, R. & Juchem, S. O. (2003). Controlled breeding programs for reproductive management. *Advances in Dairy Technology* 15, 49-68

Santos, J. E., Thatcher, W. W., Pool, L. & Overton, M. W. (2001). Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *J Anim Sci*, 79:2881-2894

Sartori, R. (2006). Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de leite. Comunicação apresentada no 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Brasil

Selk, G. (2002). Artificial Insemination for Beef Cattle. Division of Agricultural Sciences and Natural Resources, Oklahoma State University. Acedido a 5 de Fevereiro de 2014 em <http://www.thecattlesite.com/articles/721/artificial-insemination-for-beef-cattle/>

Simões, J. & Valentim, R. (2007). Sincronização do estro e da ovulação após tratamento progestagénico associado a eCG ou hCG em cabras nulíparas da raça Serrana. *Redvet*: 2007, vol. VIII nº 6

Stevenson, J. S., Johnson, S. K., Medina-Britos, M. A., Richardson-Adams, A. M. & Lamb, G. C. (2003). Resynchronization of estrus in cattle of unknown pregnancy status using estrogen, progesterone, or both. *J Anim Sci*, 81:1681-1692

Taponen, J. (2009). Fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51:48

Tenhagen, B-A., Surholt, R., Wittke, M., Vogel, C., Drillich, M. & Heuwieser, W. (2004). Use of Ovsynch in dairy herds – differences between primiparous and multiparous cows. *Anim Reprod Sci*, 81:1-11

Thatcher, W., Bilby, T., Bartolome, J., Silvestre, F., Staples, C. & Santos, J. (2006). Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology* 65, 30-44

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM; 2007). Manejo reproductivo en bovinos en sistemas de producción de leche. México: UNAM

Walsh, R. B., LeBlanc, S. J., Vernooy, E. & Leslie, K. E. (2008). Safety of a progesterone-releasing intravaginal device as assessed from vaginal mucosal integrity and indicators of systemic inflammation in postpartum dairy cows. *Can J Vet Res*, 72:43-49

Wentink, G. H. (2004). Artificial insemination and diseases transmitted by semen. In: A. H. Andrews (Ed.), *Bovine Medicine Diseases and Husbandry of cattle* (2^a ed., pp. 627-633). Oxford, UK: Blackwell Science

Whisnant, C. S., Washburn, S. P. & Farin, P. W. (2000). Current concepts in synchronization of estrus and ovulation of dairy cows. *Proc Am Soc An Sci*, 20:1-8